

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

SYNTHÈSE ET ÉVALUATION *IN VIVO* DE MICROPARTICULES  
D'HYDROGEL

THÈSE  
PRÉSENTÉE  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR  
JACQUES JEAN-FRANÇOIS

AVRIL 2004

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## AVANT-PROPOS

Ce travail est le fruit de 4 longues années de labeur entrecoupées de joies et de frustrations et à son terme j'ai encore des doutes. L'approche abordée dans cette étude était-elle la meilleure et si oui a-t-on pu l'exploiter à fond. En dehors proprement de l'aspect académique, ce projet de recherche a eu un impact important dans ma formation et ma maturité comme chercheur et comme être humain. Ce travail je tiens donc à le dédier en premier lieu à mes parents qui malgré la distance m'ont fourni des motifs d'encouragement.

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à mon directeur de recherche, le Dr Guy Fortier, pour avoir cru en moi et confié ce projet ; je ne pourrai passer sous silence ses conseils, sa patience, sa compréhension et son soutien financier qui ont permis à ce projet d'être mené à son terme. J'associe à ces remerciements mes collègues de laboratoire dont Anissa Cherif et plus particulièrement le Dr Ping He et Liu Yaode qui ont activement contribué au projet. Je suis aussi redevable de l'aide fournie par le personnel de l'animalerie de l'UQAM lors de l'élaboration des protocoles *in vivo* et des manipulations sur les animaux en particulier Marie-Claude Gagnon, D.M.V., et Sophie Ouellette et Pascale Chamberland, techniciennes animalières. Je remercie Mr Michel Marion pour l'aide inestimable fournie lors des expériences en cytométrie de flux. Mes remerciements s'adressent également au Dr Roch Thibert de Merck Frosst Canada pour sa contribution à la mesure de la taille des microparticules et à Mr Bertrand Fournier du SCAD (UQAM) pour les analyses statistiques. Je remercie aussi tout le personnel du département de chimie-biochimie de l'UQAM qui a contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce projet.

Je joins à mes remerciements mes cousines à Montréal, mes frères, ma famille aux Etats-Unis et mes amis pour leur soutien sans faille. Ce travail c'est un peu aussi votre part.

## RÉSUMÉ

Des microparticules d'hydrogel ont été synthétisées par une émulsion eau dans huile sous agitation mécanique. Elles résultent de la réticulation chimique de poly(éthylène glycol) et d'albumine de diverses sources (bœuf, rat). Leur diamètre varie entre 3 et 50  $\mu\text{m}$  et leur contenu en eau (EWC) oscille entre 95 et 98%. La vitesse d'agitation mécanique et la masse moléculaire du poly(éthylène glycol) utilisé pour la synthèse sont les deux paramètres les plus importants déterminant la taille des microparticules. Ces dernières possèdent une charge de surface négative, se dispersent très bien et sont stables à 4°C pour des périodes de 1 à 10 mois.

Des microparticules de diamètre 3 et 10  $\mu\text{m}$  ont été synthétisées par la méthode d'émulsion et marquées à l'iode-125 pour étudier leur biodistribution et leur temps de résidence dans la circulation sanguine chez le rat mâle Sprague Dawley. Les microparticules de 10  $\mu\text{m}$ , administrées par injection intraveineuse, se retrouvent à plus de 90% dans le poumon et sont absents de la circulation sanguine. Quatre-vingt % des particules de 3  $\mu\text{m}$  se retrouvent au foie mais leur temps de résidence dans la circulation est très faible. Le mécanisme de capture de ces microparticules de 3  $\mu\text{m}$  est renversé par des injections multiples de ces microparticules qui induit une saturation du mécanisme de capture ou en incubant au préalable les microparticules dans du Triton X-100. Des modifications chimiques de surface (amination, pegylation, lipidation) de microparticules de 3  $\mu\text{m}$  incubées dans du Triton X-100 n'ont pas altéré significativement la biodistribution cependant la clairance sanguine semble être affectée par la charge de surface ou potentiel zêta. Ainsi les particules aminées qui ont le plus faible potentiel zêta (-11mV) résident plus longtemps dans la circulation sanguine que les particules pegylées (-18mV). La présence du surfactant Triton X-100 est nécessaire cependant pour retrouver les temps de demi-vie élevés allant de 6 à 8 heures chez le rat.

Les études de biocompatibilité effectuées dans la cavité péritonéale du rat avec les particules natives ou modifiées chimiquement ont montré des réponses similaires à celles d'une solution saline au niveau des marqueurs de l'activation des macrophages péritonéaux. La seule différence significative notée se retrouve au niveau de l'activité phagocytaire supérieure des macrophages péritonéaux isolés des rats traités avec des microparticules natives, pegylées ou lipidées de 3  $\mu\text{m}$ . Les macrophages isolés des rats traités avec des microparticules aminées possèdent par contre une activité phagocytaire significativement moindre comparativement à ceux provenant de rats injectés avec du salin.

L'administration de microparticules natives de 3  $\mu\text{m}$  marquées à l'iode-125 par instillation intratrachéale a montré une distribution non-uniforme dans les lobes pulmonaires du rat. On observe une accumulation préférentielle dans le poumon gauche avec une activité spécifique de 84nCi/g de tissu. Une étude de biocompatibilité pulmonaire effectuée à une dose de 133mg de matériel humide/kg d'animal n'a décelé aucun effet adverse au niveau des divers marqueurs de l'inflammation pulmonaire chez le rat normal. La seule exception se situe au niveau de l'activité phagocytaire significativement inférieure des macrophages alvéolaires isolés des rats traités avec des microparticules probablement dû à un phénomène de saturation. A cause de leur diamètre de 3  $\mu\text{m}$  et la faible réponse pulmonaire suite à leur administration, ces microparticules constituaient un vecteur idéal pour évaluer l'efficacité *in vivo* de

l'insuline. Des rats diabétiques ont été traités par une instillation unique de microparticules de 3µm chargées d'insuline (5.4IU) ; 3 heures après l'injection, la glycémie résiduelle se situait à 20% et se maintenait à cette valeur pour la durée de l'expérience soit huit heures. A doses similaires, une solution d'insuline administrée par instillation ou par voie sous-cutanée revenaient à des valeurs normales 3 à 4 heures après le début du traitement. Les rats provenant de cette étude et sacrifiés 7 jours après le traitement ont subi un lavage bronchoalvéolaire. L'examen des marqueurs de l'inflammation pulmonaire chez des rats diabétiques traités avec des microbilles vides (Groupe 3) ou des microbilles chargées avec de l'insuline (Groupe 4) montre une augmentation significative du nombre de cellules, de l'activité LDH et de l'activité phagocytaire des macrophages péritonéaux par comparaison au Groupe 1 composé de rats sains et instillés avec une solution saline. La comparaison avec d'autres groupes contrôles souligne l'influence de l'état diabétique sur la réponse observée au niveau des différents marqueurs de l'inflammation pulmonaire.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet concordent pour démontrer que les microparticules hydrophiliques à base de PEG-albumine possèdent certaines des propriétés requises pour leur utilisation *in vivo*. Elles sont versatiles à cause de la simplicité de la synthèse et de la capacité à moduler leur taille ou leur chimie de surface en fonction d'applications spécifiques. Elles sont hautement hydrophiles et biocompatibles chez le rat. Et finalement, comme l'étude par voie pulmonaire chez le rat diabétique l'a démontré, ces microparticules représentent des vecteurs intéressants pour l'administration de protéines ou peptides thérapeutiques par cette voie d'administration encore peu exploitée.

# TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS.....	i
RÉSUMÉ.....	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi

1.0-INTRODUCTION.....	1
1.1 Libération contrôlée.....	1
1.2 Contexte socio-économique de la libération contrôlée.....	3
1.2.1 Personnes âgées.....	3
1.2.2 Médicaments génériques.....	4
1.2.3 Biopharmaceutiques.....	4
1.3 Contexte technologique de la libération contrôlée.....	5
1.3.1 Science des matériaux.....	5
1.3.2 Pharmacologie.....	7
1.3.3 Génomique- Protéomique.....	7
1.3.4 Thérapie génique.....	8
1.4 Vecteurs de transport et de libération contrôlée de médicaments.....	9
1.4.1 Nano-, et microparticules.....	9
1.4.1.1 Micro-, et nanoparticules obtenues à partir de polymères préformés.....	12
1.4.1.2 Micro-, et nanoparticules synthétisées par dispersion de polymères préformés.....	15
1.4.1.2.1 Macromolécules naturelles.....	15
1.4.1.2.2 Macromolécules synthétiques.....	19
1.4.2 Liposomes.....	21
1.4.3 Nanoparticules solides lipidiques (SLN).....	26
1.4.4 Micelles.....	27
1.5 Voies d'administration.....	30
1.5.1 Voie orale.....	32
1.5.1.1 Physiologie gastro-intestinale.....	32
1.5.1.2 Barrières anatomiques et physiologiques.....	33
1.5.1.3 Absorption gastro-intestinale.....	34
1.5.1.4 Tendances et applications.....	35
1.5.1.4.1 Inhibiteurs enzymatiques.....	36
1.5.1.4.2 Conjugués protéines-PEG.....	36

1.5.1.4.3	Promoteurs de l'absorption.....	37
1.5.1.4.4	Modification des jonctions serrées.....	37
1.5.1.4.5	Micro-nanoparticules et vaccins.....	38
1.5.2	Voie intraveineuse.....	40
1.5.2.1	Physiologie vasculaire.....	40
1.5.2.2	Barrières physiologiques.....	41
1.5.2.3	Barrière physiologique aux principes actifs particuliers: RES	41
1.5.2.4	Tendances et applications.....	42
1.5.2.3.1	Vecteurs solubles : bioconjugaison.....	42
1.5.2.3.2	Vecteurs particuliers.....	44
1.5.2.3.2.1	Stabilisation stérique.....	45
1.5.2.3.2.2	Adsorption en surface: Cas des surfactants.....	45
1.5.2.3.2.3	Addition covalente : cas du PEG.....	47
1.5.3	Voie nasale.....	50
1.5.3.1	Anatomie et physiologie nasale.....	50
1.5.3.2	Mucus et clairance mucociliaire.....	51
1.5.3.3	Poids moléculaire du médicament.....	51
1.5.3.4	Tendances et applications.....	52
1.5.3.4.1	Promoteurs de l'absorption nasale.....	52
1.5.3.4.2	Polymères et microsphères.....	54
1.5.3.4.3	Vaccination par voie nasale.....	55
1.5.4	Voie intrapulmonaire.....	58
1.5.4.1	Anatomie et physiologie pulmonaire.....	58
1.5.4.2	Inhalation.....	59
1.5.4.2.1	Le transport paracellulaire via les jonctions serrées...	62
1.5.4.2.2	Le transport par les pores membranaires.....	62
1.5.4.2.3	Le transport vésiculaire ou transcytose.....	63
1.5.4.2.4	Endothélium vasculaire.....	63
1.5.4.2.5	Macrophages et enzymes.....	64
1.5.4.3	Tendances et applications.....	65
1.5.4.3.1	Administration de protéines thérapeutiques par voie pulmonaire.....	65
1.5.4.3.2	Vecteurs de transport de biothérapeutiques pour l'inhalation pulmonaire.....	69
1.5.4.3.2.1	Liposomes.....	69
1.5.4.3.2.2	Micro-, nanoparticules.....	70
1.5.4.3.3	Emploi de promoteurs de l'absorption.....	71
1.6	Hydrogels.....	72

1.6.1 Hydrogels conventionnels.....	76
1.6.2 Hydrogels intelligents.....	77
1.6.2.1 Hydrogels thermosensibles.....	77
1.6.2.2 Hydrogels pH-sensibles.....	79
1.7 Biocompatibilité.....	80
1.7.1 Activation du complément.....	82
1.7.2 Réponse inflammatoire.....	84
1.7.3 Interactions microsphères/tissus: cas des microsphères de PLA/PLGA.....	86
1.8 Objectifs du projet de doctorat.....	87
 2.0 SECTION EXPÉRIMENTALE.....	 90
2.1 Synthesis and <i>in vitro</i> characterization of Poly(ethylene glycol)-albumin hydrogel microparticles.....	93
2.2 Hydrogel microparticles of PEG-albumin: Influence of size and surface nature on their biodistribution and elimination in rat.....	121
2.3 Cellular and biochemical short-term responses to RSA-PEG hydrogel microparticles injected in the rat peritoneum.....	159
2.4 Instillation of RSA-PEG hydrogel microparticles in lungs of normal and diabetic rats.....	189
 3.0 CONCLUSION.....	 223
 4.0 BIBLIOGRAPHIE.....	 227



## LISTE DES TABLEAUX

### TABLEAUX

I	Principaux biomatériaux polymériques.....	6
II	Méthodes de synthèse des différents types de particules et leurs applications....	11
III	Formulations liposomales disponibles sur le marché ou rendu en études cliniques.....	24
IV	Applications de la matrice d'acide poly(lactique-co-glycolide) pour l'immunisation orale.....	39
V	Exemples de poloxamères et de poloxamines et de leurs applications.....	48
VI	Produits pharmaceutiques obtenus sur ordonnance et administrés par voie nasale.....	53
VII	Biothérapeutiques administrés par voie pulmonaire.....	67
VIII	Monomères utilisés pour la synthèse d'hydrogels.....	73
IX	Polymères naturels préformés utilisés pour la synthèse d'hydrogels.....	74
X	Polymères synthétiques préformés utilisés pour la synthèse d'hydrogels.....	75

### MANUSCRIT I

#### TABLEAU

1	The physicochemical characteristics of the hydrogel microparticles synthesized with PEG of different molecular masses at their optimal molar ratio.....	110
2	The physicochemical characteristics of hydrogel microparticles synthesized at 2000rpm with different types of albumin at a stirring speed of 2000 rpm.....	111
3	Effect of the oil type on the characteristics of the hydrogel microspheres synthesized at 2000rpm.....	112
4	The physicochemical characteristics of hydrogel microparticles prepared at various stirring rate using optimal ratio of reagents.....	113
5	Characteristics of hydrogel microparticles synthesized with PEG of various M.W. at different molar ratio (HO:NH <sub>2</sub> ) at 2000rpm and evaluation of the amounts of proteins and PEGs released during the washing of microparticles...	114
6	Zeta potential of PEG-Albumin microparticles synthesized at a stirring	

speed of 2000rpm.....	115
7 Storage stability at 4 °C of albumin-PEG microparticles prepared under different conditions.....	116

## MANUSCRIT 2

### TABLEAU

1 Physical characteristics of albumin-PEG microspheres.....	148
2 Pharmacokinetic parameters of 3µm BSA-PEG microparticles after Intravenous injection.....	149

## MANUSCRIT 3

### TABLEAU

1 Physical characteristics of RSA-PEG microspheres.....	183
---------------------------------------------------------	-----

## MANUSCRIT 4

### TABLEAU

1 Short term cellular and biochemical response of intratracheally treated rats.....	218
2 Cellular and biochemical response of healthy and diabetic rats to intratracheal instillation after seven days.....	219

## LISTE DES FIGURES

### FIGURE

1	Libération contrôlée vs dosage conventionnel.....	2
2	Les deux modèles de particules utilisées en libération contrôlée.....	10
3	Liposomes et les divers modes d'association des lipides formant la couche lipidique de surface.....	22
4	Distribution d'un principe actif dans une micelle en fonction de son hydrophobicité.....	29
5	Voies d'administration d'un médicament.....	31
6	Structure chimique de poloxamines, de poloxamères et de PEG.....	46
7	Structure et fonction d'une alvéole pulmonaire.....	60
8	Principe de libération contrôlée d'un système insuline/glucose oxydase	81
9	Les principales fonctions du complément.....	83
10	Comparaison des voies classique et alterne d'activation du complément.....	83

### MANUSCRIT 1

#### FIGURE

1	Optical Micrograph of PEG-albumin hydrogel microparticles.....	117
2	Size distributions of the PEG-albumin hydrogel microparticles.....	118
3	Viscosity of PEG solutions of various molecular masses at the concentrations used to synthesize the microparticles.....	119

### MANUSCRIT 2

#### FIGURE

1	Size distribution of RSA-PEG and BSA-PEG microparticles.....	150
2	Effect of size of the microparticle on the final biodistribution of PEG-albumin microparticles.....	151
3	Effect of Triton X-100 on blood clearance of 3µm RSA-PEG and BSA-PEG microparticles.....	152
4	Effect of multiple injections on 3µm BSA-PEG microparticles blood clearance	153
4	Effect of surface nature on the biodistribution of 3µm BSA-PEG microparticles.....	154
6	Blood clearance of different doses of lipidated 3µm BSA-PEG microparticles...	155

7	Blood clearance of 5 $\mu$ Ci/kg of aminated and native microparticles.....	156
8	Blood clearance of 11 $\mu$ Ci/kg of aminated, pegylated and lapidated microparticles.....	157

### MANUSCRIT 3

#### FIGURE

1	Flow cytometry analysis of peritoneal macrophages.....	184
2	Time-kinetics of various macrophage activation parameters.....	185
3	Effect of surface chemistry of the microparticles on the activation of macrophages.....	186
4	Effect of the number of microparticles injections on the activation of macrophages.....	187

### MANUSCRIT 4

#### FIGURE

1	Pulmonary biodistribution of radioactive 3 $\mu$ m RSA-PEG microparticles.....	220
2	<i>In vitro</i> release profiles of insulin solution and insulin-loaded 3 $\mu$ m RSA-PEG microparticles.....	221
3	Hypoglycemic effect of a single intratracheal administration of insulin-loaded 3 $\mu$ m RSA-PEG microparticles in diabetic rats.....	222

## ABRÉVIATIONS

Ac: Anticorps

ADN: Acide désoxyribonucléique

Da: Dalton

DNAse: Desoxyribonucléase

°C : Degré Celsius

E: Coefficient d'extinction molaire

EWC: Equilibrium water content

FACS: Fluorescence activated cell sorter

FITC: Fluorescéine isothiocyanate

h: Heure

IgG : Immunoglobuline G

IU : International Unit

kDa : Kilodalton

µm : Micromètre

min: Minute

mg : Milligramme

ml : Millilitre

nm: Nanomètre

PACA: Poly(alkyl cyanoacrylate)

PECA: Poly(ethyl cyanoacrylate)

PEG: Poly(ethylene glycol)

PEO: Poly(ethylene oxyde)

PBS: Tampon phosphate salin

PLA: Acide polylactique

PLGA: Poly(lactide-co-glycolide)

PMA: Poly(méthacrylate)

rpm: Rotation par minute

TEA: Triéthyl amine

# 1.0-Introduction

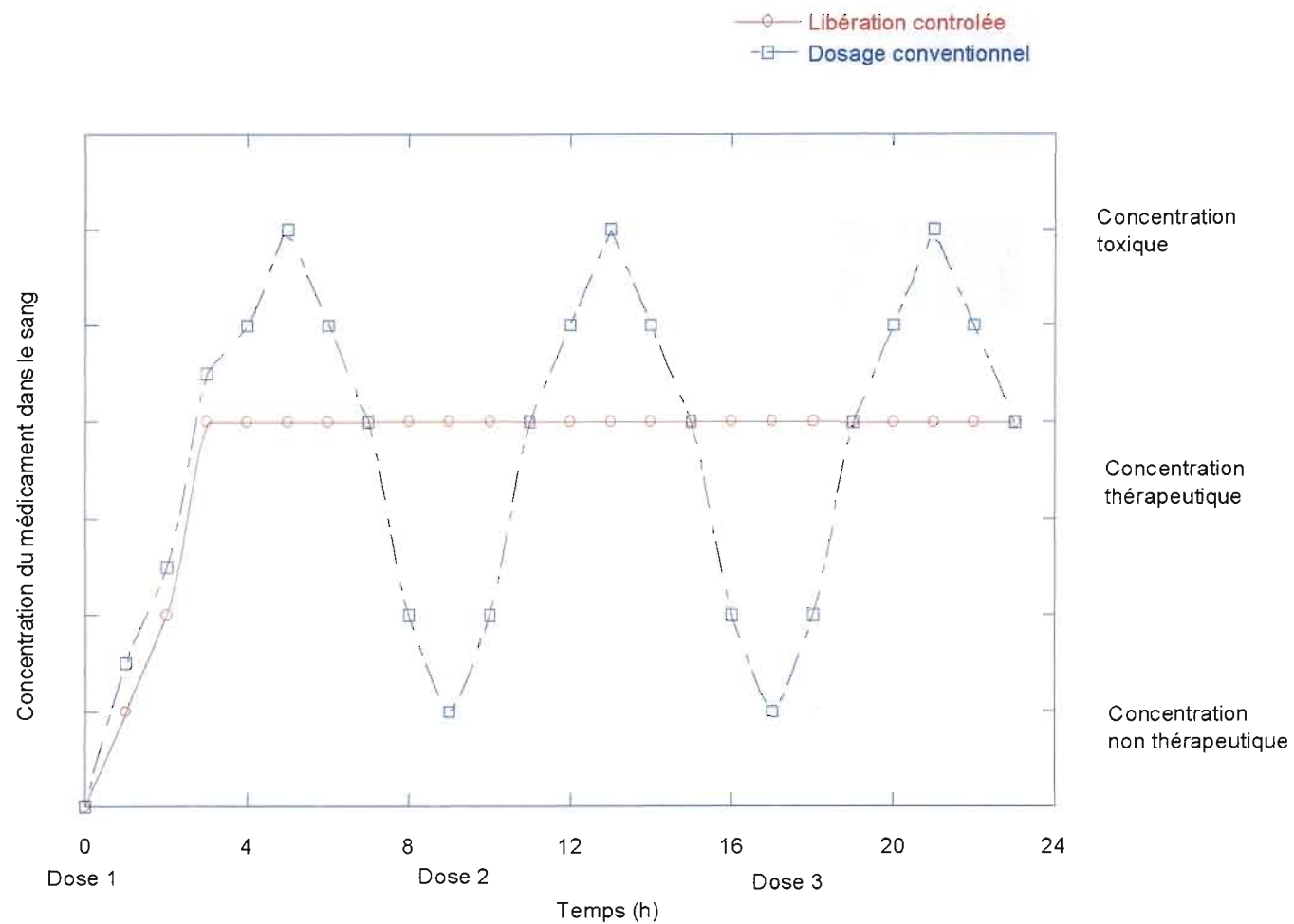
## 1.1 Libération contrôlée

Depuis que les travaux de Langer et Folkman ont démontré au cours des années 1970 l'utilité thérapeutique de la libération contrôlée des médicaments (Langer et Folkman, 1976), ce concept a eu un impact important dans toutes les branches de la médecine. Ce concept s'est révélé si avantageux qu'il s'est propagé à d'autres domaines comme l'agriculture (libération contrôlée de pesticides et de fertilisants), l'alimentation et les fragrances (Schudel et Ringgenberg, 2001; Langer 1998).

Qu'entend-on par libération contrôlée? Selon Robinson, ce concept regroupe tout système exerçant un contrôle soit spatial, soit temporel ou bien les deux à la fois sur la libération d'un médicament (Li, Lee et Robinson, 1987). Un tel système comporte plusieurs avantages comparativement au médicament classique parmi lesquels on note : 1) le maintien prolongé de la concentration thérapeutique du médicament (Figure 1); 2) une diminution des effets secondaires indésirables par ciblage du médicament à un type cellulaire; 3) une diminution de la dose requise pour l'action thérapeutique; 4) un meilleur respect par les patients de la posologie; 5) un outil approprié pour l'administration de biopharmaceutiques ayant une courte demi-vie *in vivo* (protéines et peptides) (Langer, 1998). De manière générale, ces systèmes de libération contrôlée ont une vitesse de libération d'ordre zéro, donc indépendante de la concentration du médicament. Des systèmes de libération contrôlée intelligents qui réagissent en fonction des conditions du milieu sont encore au stade de développement et seront bientôt disponibles sur le marché.

Les systèmes pour la libération contrôlée se divisent en trois grandes classes :

- 1) Les vecteurs de première génération (microsphères et microcapsules) libèrent leur contenu à un site précis mais nécessitent une voie d'administration particulière habituellement *per os*.
- 2) Les vecteurs de deuxième génération (érythrocytes fantômes, liposomes, nanosphères, nanocapsules) véhiculent leur contenu par une voie générale (sang, lymphe).



**Figure 1:** Libération contrôlée vs dosage conventionnel. Pour maintenir une concentration thérapeutique, il faut 3 doses du dosage conventionnel contre une dose unique en libération contrôlée pour la même période de temps. Tiré de Hsieh D. (1988) *Controlled Release Systems*.

- 3) Les vecteurs de troisième génération (anticorps (Ac) monoclonaux, vecteurs de première ou deuxième génération couplés à des Ac monoclonaux ou à d'autres ligands) possèdent un très haut degré de spécificité. Ils sont capables de cibler de manière précise un organe ou une certaine population de cellules (Puisieux et *al.*, 1994).

Avant de s'attarder sur le développement et les caractéristiques de chaque type de vecteur, nous allons d'abord examiner dans quel contexte s'est effectué ce virage de l'industrie pharmaceutique, c'est-à-dire d'un mode de dosage conventionnel vers un mode de libération contrôlée.

## **1.2 Contexte socio-économique de la libération contrôlée**

Plusieurs facteurs socio-économiques se conjuguent pour expliquer le virage de l'industrie pharmaceutique vers les systèmes de libération contrôlée.

### **1.2.1 Personnes âgées**

Dans les pays industrialisés, on assiste à un vieillissement marqué de la population à cause de la dénatalité et de l'accroissement de la longévité. En Amérique du Nord, les personnes âgées de plus de 65 ans représentent 12 % de la population et ce chiffre ne cesse de croître. Ce phénomène alourdit les dépenses reliées aux régimes publics et privés de retraite et des soins de santé (Carette, 1992). Dû à un vieillissement physiologique, certains aînés doivent s'astreindre à prendre plusieurs médicaments simultanément, accentuant ainsi les risques d'interactions médicamenteuses nocives et les problèmes de respect des posologies. Or, 15% des hospitalisations aux Etats-Unis, plus de 100,000 décès et 136 milliards de dollars en coûts de santé chaque année sont attribuables à des effets nocifs de médicaments administrés (Classen et *al.*, 1997; Cramer et Saks, 1994). De plus, un autre 10% des hospitalisations sont dus à un manque de suivi par le patient de la posologie prescrite (Cramer et Saks, 1994; Mc Kenney et Harrison, 1976). La conception de systèmes de libération contrôlée à prise unique quotidienne permettra de diminuer les coûts reliés aux hospitalisations tout en améliorant le respect de la posologie par le patient.



### 1.2.2 Médicaments génériques

Le développement d'une nouvelle molécule ayant des effets thérapeutiques recherchés implique une procédure longue et complexe tant au plan scientifique que juridique. En effet, cette molécule est soumise à une série d'essais pour évaluer ses caractéristiques pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et toxicologiques d'abord chez des animaux modèles puis, chez l'humain par une série d'études cliniques. C'est un processus onéreux pouvant atteindre les 600 millions de dollars US (Boulnois, 2000). L'obtention d'un brevet pour cette nouvelle molécule en permet l'utilisation exclusive pendant 20 ans. Finalement, une approbation pour son utilisation chez l'humain, doit être obtenue auprès d'un organisme national tel Santé Canada. Dès lors, la phase de mise en marché peut débiter. L'entreprise dispose d'environ 10 ans pour rentabiliser les coûts de recherche et développement (R & D) associés à cette molécule, car à l'expiration du brevet, la molécule fera partie du domaine public. Toute entreprise pourra alors proposer des copies génériques à des coûts moindres. Pour faire face à la concurrence posée par les médicaments génériques, il peut être avantageux pour la compagnie innovatrice de présenter sous une nouvelle forme galénique comme par exemple, sous la forme d'un médicament à libération contrôlée et d'obtenir un nouveau brevet.

### 1.2.3 Biopharmaceutiques

Le développement de macromolécules thérapeutiques (protéines, peptides, ADN), grâce aux progrès du génie génétique, occupe une place majeure dans l'industrie pharmaceutique depuis les vingt dernières années. Trois produits obtenus par génie génétique se classaient parmi les 10 produits thérapeutiques les plus vendus en 1993 : l'érythropoïétine (Amgen), l'insuline (Novo Nordisk) et l'alpha-interféron (Roche); et on pense que cette tendance ira en s'accroissant avec les années (Mackay, 1997). Un nombre important de protéines thérapeutiques sont à l'étape de mise en marché ou en stade d'essais cliniques comme les anticorps monoclonaux, les facteurs de croissance et les récepteurs solubles. En dépit de leur énorme potentiel thérapeutique, ces macromolécules présentent certains désavantages qui limitent leur utilisation : elles sont conçues pour être administrées par injection intraveineuse, leurs biodisponibilités orale, transdermale ou

musculaire sont faibles et leur demi-vie *in vivo* est relativement courte. L'une des stratégies proposées pour pallier à ces inconvénients est une formulation à libération contrôlée qui permettrait le maintien d'une concentration thérapeutique plasmatique de ces protéines recombinantes sur une période prolongée (Putney, 1998).

### **1.3 Contexte technologique de la libération contrôlée**

Des progrès dans plusieurs branches de la recherche scientifique ont contribué à l'essor de la libération contrôlée. On peut citer entre autres les avancées réalisées dans les domaines suivants :

#### **1.3.1 Science des matériaux**

Les polymères sont la clef de voûte du concept de libération contrôlée. Ils ont été utilisés en tout temps dans l'histoire de la médecine souvent de façon empirique. Dans les années 1960 à 1970, les polymères déjà disponibles sur le marché étaient utilisés pour développer des formulations de libération contrôlée de médicaments. Cette approche empirique a été rapidement délaissée pour une approche plus intégrée et plus rationnelle combinant les expertises de plusieurs champs d'études afin obtenir des polymères avec des propriétés chimiques, physico-chimiques, mécaniques et biologiques bien précises (Angelova et Hunkeler, 1999). Cette intégration des connaissances en science des matériaux a permis la conception d'IPN (Interpenetrating Polymer Networks) dont les propriétés peuvent être ajustées en modulant les proportions de chacun des composants dans le mélange. Les IPN sont utilisés couramment en libération contrôlée et le remplacement de tissu. D'autre part, la découverte de nouveaux polymères naturels aux propriétés intéressantes pour les applications *in vivo*, élargit l'éventail des possibilités pour la conception de nouveaux matériaux à usage thérapeutique (Tableau 1).

**Tableau I : Principaux biomatériaux polymériques**

Polymère	Applications
<b>Polymères Naturels</b>	
<b>Protéines</b>	
Collagène	Pansement, microsphères
Albumine	Microencapsulation de cellules et médicaments
	Hydrogel, matrice d'immobilisation
<b>Acides polyaminés</b>	
Poly-L-lysine	Vecteur oligomérique de médicaments
<b>Polysaccharides et dérivés</b>	
Carboxyméthyl cellulose	Immobilisation de cellules
Agarose	Matrice d'immobilisation
Alginate	Matrice d'immobilisation pour cellules et enzymes
Héparine	Propriétés anti-coagulantes
Dextran	Vecteur de médicaments
Chitosan	Systèmes de libération contrôlée
<b>Polymères synthétiques</b>	
<b>Polyesters aliphatiques</b>	
Acide polylactique (PLA)	Sutures, systèmes de libération de médicaments,
Acide polyglycolique (PLGA)	Ingénierie de tissus
Poly(hydroxybutyrate)	Matrice pour systèmes de libération contrôlée
	Microencapsulation de cellules
<b>Polyanhydrides</b>	Ingénierie de tissus, libération de molécules bioactives
<b>Poly(orthoesters)</b>	Libération continue de médicaments
<b>Poly(cyanoacrylates)</b>	Adhésifs chirurgicaux
<b>Polyphosphazènes</b>	Hydrogels, libération de médicaments
<b>Poly(vinyl alcool)</b>	Libération thérapeutique, encapsulation de cellules
<b>Poly(hydroxyéthyl méthacrylate)</b>	Hydrogels, lentilles oculaires
<b>Poly(méthyl méthacrylate)</b>	Implants dentaires
<b>Poly(éthylène oxyde-propylène oxyde)</b>	Libération de protéines
<b>Poly(N-alkylacrylamide)</b>	Gels thermo-sensibles

Tiré de Angelova N. et Hunkeler D. (1999) *Trends Biotech.* **17**, 409-421.

### 1.3.2 Pharmacologie

Le concept d'homéostasie qui signifie l'équilibre du milieu interne, était le dogme en vigueur en pharmacologie et l'effort thérapeutique visait quant à lui à rétablir cet équilibre perturbé. Cependant, ce concept a été remis en question par l'émergence de la chronobiologie, la science des rythmes biologiques et son corollaire la chronopharmacologie. Ainsi les produits homéostatiques conçus pour une libération continue ne sont pas adaptés à des maladies dont la sévérité ou l'incidence varie dans le temps (Smolensky et Portaluppi, 1999). Plusieurs phénomènes biologiques se déroulent selon une horloge biologique interne dite rythme circadien. De multiples études épidémiologiques ont montré que plusieurs états pathologiques suivent un rythme circadien incluant des maladies respiratoires (asthme, allergies) et cardiovasculaires (hypotension, angine, infarctus du myocarde) (Carter, 1998; Neutel et Smith, 1997). Plus récemment, suivant les travaux sur le génome humain, l'identification de certains gènes régissant le métabolisme des médicaments permettra de sélectionner le médicament le plus efficace pour le traitement d'une maladie en tenant compte des différences génétiques des individus. Cette approche a donné naissance à cette nouvelle discipline qu'est la pharmacogénétique (Boulnois, 2000).

### 1.3.3 Génomique- Protéomique

Le décodage récent du génome humain fournit l'outillage nécessaire pour une meilleure compréhension de la physiopathologie (maladie) au niveau moléculaire. La compréhension des mécanismes impliqués dans une maladie permettra de mettre au point des médicaments plus efficaces. Dans certaines pathologies, si la cible thérapeutique ne peut être identifiée avec certitude au niveau des gènes, elle peut l'être cependant au niveau des protéines en cause. Ces dernières étant aujourd'hui encore les cibles privilégiées des médicaments, l'étude du génome au niveau de l'expression protéique est de grande importance.

L'émergence de la protéomique, discipline étudiant le protéome qui est le complément protéique du génome, est relativement récente et deux grandes sous-disciplines y émergent. La première est la "protéomique d'expression" et elle s'intéresse à

la création d'une cartographie quantitative de l'expression protéique au niveau des cellules. Elle trouvera ses applications en clinique lorsqu'une perturbation de l'expression protéique pourra être corrélée à un état pathologique ou à l'action d'un médicament (Blackstock et Weir, 1999). La deuxième est appelée "protéomique de cartographie cellulaire" et elle s'intéresse à la localisation systématique subcellulaire des complexes protéiques. Les informations sur la localisation de ces complexes seront d'une grande importance pour déterminer leurs fonctions et pour valider de nouvelles cibles thérapeutiques. La génomique et la protéomique s'associent donc pour permettre la découverte de nouvelles protéines et de nouvelles cibles thérapeutiques.

### 1.3.4 Thérapie génique

Les premières études de transfert de gènes ont débuté dans les années 1990 et cette nouvelle forme de thérapie a été une révolution en médecine car pour la première fois, on s'attaquait à la cause d'une maladie chronique et non simplement aux symptômes. La thérapie génique implique l'utilisation d'un vecteur (virus atténués, lipides cationiques, nanoparticules polymériques) pour libérer à un site précis un segment d'ADN. Cette approche innove par sa spécificité d'action et par sa durée d'action qui sont supérieures aux méthodes thérapeutiques conventionnelles. La plupart des études cliniques effectuées en Phase I/II ont été faites sur une petite échelle. Elles ont démontré l'innocuité de la méthode. Cependant les études d'efficacité se sont révélées décevantes en terme d'expression du gène *in vivo* et des effets bénéfiques cliniques. Suite aux recommandations d'une commission nommée par le NIH (National Institute of Health, États-Unis) des progrès ont été accomplis au niveau de la standardisation des protocoles, du développement de vecteurs et de l'amélioration du transfert et de l'expression génique (Mountain, 2000). Des signes encourageants ont été notés comme la stimulation de l'angiogénèse par le gène de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) chez des personnes atteintes d'ischémie membranaire (Baumgartner et *al.*, 1998) et la production d'une protéine fonctionnelle par le gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) chez les patients souffrant de fibrose kystique (Wagner, 1998). Pour ces 2 cas, le véhicule de transfection utilisé était différent. Pour le traitement de l'ischémie membranaire un ADN nu a été utilisé alors que le virus adéno-transportant le

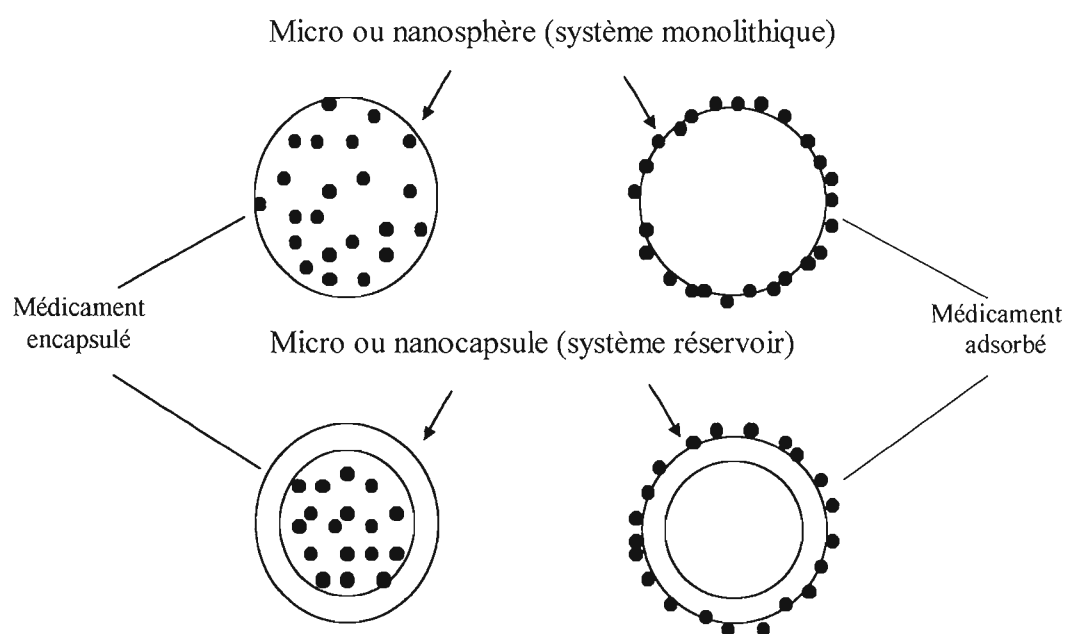
gène a servi pour le traitement de la fibrose cystique. Il s'avère que le choix du vecteur est un des facteurs clés dans la réussite de la thérapie génique. Chaque type de vecteur possède ses avantages et inconvénients; alors que les virus atténués (adénovirus, rétrovirus) démontrent une bonne transfection et une expression prolongée, on ne peut ignorer les risques potentiels d'immunogénicité (Robbins et *al.*, 1998). D'un autre côté, les liposomes et les nanoparticules polymériques sont très peu immunogéniques mais leur efficacité de transfection *in vivo* est faible (Blaese et *al.*, 1995). La thérapie génique représente une des voies d'avenir pour le traitement de certaines pathologies sévères pour lesquelles il n'existe pas de traitement alternatif. Les progrès de cette thérapie ne pourront se poursuivre sans la mise au point de vecteurs plus performants.

#### **1.4 Vecteurs de transport et de libération contrôlée des médicaments**

Le domaine de la libération contrôlée de médicaments est un secteur de la biotechnologie médicale en pleine progression. Les systèmes de libération contrôlée offrent des avantages intéressants quand comparés aux posologies conventionnelles : efficacité thérapeutique accrue, toxicité diminuée et un meilleur respect de la posologie par le patient. Les principaux vecteurs sont les nano- et microparticules, les liposomes et les micelles et ils sont synthétisés par différentes méthodes.

##### **1.4.1 Nano- et microparticules**

Développées au début des années 1970 comme vecteurs pour la vaccination et pour le transport de médicaments anticancéreux, les nano- et microparticules englobent dans leur définition aussi bien les sphères que les capsules. Les nanoparticules sont en général des particules colloïdales de diamètre variant entre 10 et 1000nm. Lorsque le diamètre dépasse le micron, soit entre 2 et 300µm on parle alors de microparticules. Les nano- et microsphères sont des systèmes monolithiques ayant une structure homogène dans laquelle le principe actif est dispersé ou adsorbé en surface (Figure 2). Les nano- et microcapsules possèdent une structure de type réservoir dans laquelle le médicament est confiné à une cavité centrale entourée par une membrane polymérique (Figure 2) (Allémann et *al.*, 1993). Les nano- et microsphères et les nano- et microcapsules sont préparées par différentes méthodes décrites au Tableau 2 dont les principales sont la



**Figure 2:** Les deux modèles de particules utilisées en libération contrôlée.

**Tableau II :** Méthodes de synthèse des différents types de particules et leurs applications.

Méthode	Monomère/polymère	Thérapeutique	Application	Référence
<b>1-Microcapsules</b>				
Coacervation	Éthyle de cellulose	5-fluorouracile	Anti-cancéreux	(Kato et Nemoto, 1981)
Polymérisation interfaciale	Albumine	Doxorubicine	Anti-cancéreux	(Sawaya, 1987)
<b>2- Microsphères</b>				
Évaporation de solvant	PLGA	Cisplatine	Anti-cancéreux	(Spentlehauer et <i>al.</i> , 1988)
Fusion à chaud	Cire de carnauba	5-fluorouracile	Anti-cancéreux	(Benita et <i>al.</i> , 1986)
Dénaturation thermique	Albumine	Mitomycine C	Anti-cancéreux	(Natsume et <i>al.</i> , 1990)
Réticulation chimique	Albumine	-----	Chimioembolisation	(Cremers et <i>al.</i> , 1990)
<b>3- Nanocapsules</b>				
Émulsion-polymérisation	PACA	MDP-L-alanyl-cholestérol	Immunomodulateur	(Barratt et <i>al.</i> , 1989)
Émulsification	PLA	Indométacine	Anti-inflammatoire	(Ammoury et <i>al.</i> , 1991)
<b>4- Nanosphères</b>				
Émulsion-polymérisation	PACA	Doxorubicine	Anti-cancéreux	(Brasseur et <i>al.</i> , 1986)
Émulsification	PLA	Testostérone	Maturation sexuelle	(Gurny et <i>al.</i> , 1981)
Désolvatation	Éthyl de cellulose	5-fluorouracile	Anti-cancéreux	(Mukherji et <i>al.</i> , 1990)

PLGA : poly(lactide-co-glycolide); PLA: acide poly(lactique); PACA: poly(alkyl cyanoacrylate).



polymérisation de monomères ou la dispersion de polymères préformés (Vauthier-Holtzscheler, 1991)

#### 1.4.1.1 Micro-, et nanoparticules synthétisées par une réaction de polymérisation

La méthode utilisée pour la synthèse de nanosphères de polyacrylamide est une réaction de polymérisation de l'acrylamide et de N, N'-méthylène bisacrylamide dans une microémulsion inverse (eau dans huile) (Birrenbach et Speiser, 1976). Cette méthode nécessite des solvants organiques, un surfactant et un initiateur chimique de la polymérisation qui doit être éliminé (Allémann et *al.*, 1993). Ces facteurs conjugués à la faible biodégradabilité du polyacrylamide et à la neurotoxicité du monomère utilisé lors de la synthèse ont restreint le champ d'application *in vivo* de ces particules. La première étude sur l'utilisation pharmaceutique de nanosphères est celle de Birrenbach et Speiser qui ont synthétisé des nanosphères de polyacrylamide contenant de l'IgG ou de la toxine de tétanos à des fins de vaccination (Birrenbach et Speiser, 1976).

Edman et Sjöholm ont conduit une étude exhaustive sur l'immobilisation de l'enzyme asparaginase, un agent anti-cancéreux, dans des microsphères de polyacrylamide chez la souris. Suite à l'incorporation de l'enzyme dans les microsphères, ils ont noté une stabilisation de l'activité enzymatique pendant plus de 140 jours. L'injection de cette formulation chez la souris a induit une diminution de l'asparagine plasmatique pendant une période de 4 à 15 jours. Ces microsphères enzymatiques selon la quantité d'enzyme utilisée provoquent cependant une réponse humorale dont le titre varie en fonction de la voie d'administration. Ces microsphères se sont révélées non toxiques et se sont lentement dégradées (Edman et Sjöholm, 1982; 1979a; 1979b). Edman et *al.*, ont aussi utilisé des microsphères de polyacrylamide pour stabiliser l'activité de la L-glutaminase et de la L-asparaginase. Ces microsphères enzymatiques lorsque placées dans un système de dialyse extracorporel dégradent efficacement la L-asparagine et la L-glutamine circulantes (Edman et *al.*, 1987)

Des recherches concernant la production de dérivés ou de mélanges plus biocompatibles et permettant l'utilisation *in vivo* ont eu lieu. Parmi ces dérivés, on retrouve le polyacryl d'amidon qui est biodégradable et employé dans la synthèse de microsphères qui servent de vecteur pour un vaccin de rotavirus (Stureson et *al.*, 2000).

Kreuter et *al.* ont développé une méthode simple pour fabriquer des nanosphères de poly(alkyl méthacrylate). La réaction de polymérisation du monomère méthyl méthacrylate se produit en milieu aqueux en présence d'un surfactant non-ionique dont l'utilisation est facultative et d'un initiateur de la polymérisation de nature physique ou chimique. Cette méthode a l'avantage de n'utiliser aucun solvant organique mais nécessite cependant l'élimination de l'initiateur chimique. Les nanosphères obtenues ne sont pas biodégradables. Ces nanosphères ont été utilisées pour l'incorporation des virions de l'influenza et des antigènes du HIV (Kreuter et *al.*, 1991; 1979; Kreuter et Speiser, 1976).

Les nanoparticules à base de poly(méthacrylate) (PMA) offrent en général une très bonne biocompatibilité. Elles sont aussi utilisées comme vecteurs pour la pentamidine, un agent anti-*Leishmania*. Cette formulation est plus efficace et ce à des doses plus faibles que le traitement classique utilisant la pentamidine seule (Paul et *al.*, 1998; Durand et *al.*, 1997). D'autres dérivés comme les Eudragit RS100 (acide méthacrylique/acide acrylique) et RL100 (acide méthacrylique/méthyl ester d'acide méthacrylique) permettent la synthèse de microsphères principalement utilisées pour la libération contrôlée d'agents anesthésiques comme le diflunisal (Pignatello et *al.*, 2001) ou de l'insuline (Morishita et *al.*, 1992a; 1992b).

Les nanosphères à base de poly(alkyl cyanoacrylates) (PACA) et leurs dérivés sont faciles à synthétiser et sont biodégradables, deux importantes caractéristiques pour les applications *in vivo* chez l'humain. Ces nanosphères sont préparées par une réaction de polymérisation-émulsification, dans laquelle les gouttelettes de monomères non hydrosolubles sont émulsifiées dans une phase aqueuse. L'émulsion est stabilisée généralement par un surfactant non-ionique et la taille des particules obtenues varie autour de 200nm de diamètre. Cette taille peut être encore réduite à 30nm en augmentant le pH du milieu de polymérisation ou la concentration de surfactant (Seijo et *al.*, 1990). La méthode de synthèse est très reproductible et peut facilement être produite en conditions aseptiques (Verdun et *al.*, 1986). Une variété de substances ont été incorporées dans ces nanosphères de PACA comme la doxorubicine (Couvreur et *al.*, 1982), l'insuline (Zhang et *al.*, 2001; Michel et *al.*, 1991), l'hormone de croissance (Gauthier et *al.*, 1992; Grangier et *al.*, 1991), des anticorps monoclonaux (Kubiak et *al.*, 1988), des

oligonucléotides antisens (Nakada et *al.*, 1996) etc.... Les études *in vitro* ont montré que la libération de peptides ou de médicaments à partir de ces nanoparticules, résulte de la bioérosion de la surface de la matrice polymérique et non pas d'un mécanisme de diffusion passive (Couvreur et Puisieux, 1993). Ainsi, l'érosion de la matrice dépendrait de la présence d'estérases qui hydrolysent lentement les résidus esters des polymères insolubles générant ainsi des composés hydrosolubles (Lenaerts et *al.*, 1984).

Les résultats *in vivo* les plus intéressants ont été obtenus avec des nanoparticules de poly(isobutyl cyanoacrylate) contenant de la doxorubicine utilisée dans le traitement de diverses leucémies. Brasseur et *al.* ont montré qu'une injection intraveineuse de ces nanoparticules chez des souris portant la leucémie L1210 était moins toxique et plus efficace que la doxorubicine seule. De plus, le temps de survie des souris traitées a été doublé (Brasseur et *al.*, 1986). Lorsque ces nanoparticules sont utilisées chez des souris porteuses de tumeur métastasantes au foie, une réduction du nombre et de la taille des métastases a été observée comparativement aux souris traitées avec la doxorubicine libre (Chiannilkulchai et *al.*, 1989). Les injections répétées de ces nanoparticules ne provoquent pas de toxicité chronique ou d'hépatotoxicité chez l'animal (Couvreur et *al.*, 1982).

L'efficacité de nanoparticules biodégradables de poly(isohexyl cyanoacrylate) comme matrice pour la libération du facteur de libération de l'hormone de croissance (GRF) a été étudiée par Gauthier et *al.* Un niveau plasmatique constant de GRF a été obtenu pendant 24 heures avec ces nanoparticules comparativement à la forme libre du GRF administré en sous-cutané chez la souris qui n'est plus détectable dans la plasma 100 minutes après son injection (Gautier et *al.*, 1992).

Un point intéressant à noter concernant les nanoparticules de polycyanoacrylate lorsqu'elles sont pegylées en surface est leur capacité à diffuser de la circulation vers le cerveau suite à une administration en intraveineuse. Des résultats préliminaires *in vivo* chez les souris et les rats ont montré que ces nanoparticules de poly(cyanoacrylate) pegylées en surface se concentrent dans le cerveau sans avoir recours à un surfactant comme le polysorbate 80 pour passer la barrière sang/cerveau (Calvo et *al.*, 2001).

Les nanocapsules à cause de leur structure vésiculaire permettent d'augmenter la quantité de principe actif hydrophobe incorporé dans leur matrice. Les nanocapsules de

poly(alkyl cyanoacrylate) sont obtenues par la méthode de polymérisation interfaciale. Les monomères d'alkyl cyanoacrylate sont dissous dans une phase d'éthanol contenant de l'huile et un mélange de phospholipides. L'injection de cette phase sous agitation dans de l'eau (émulsion huile dans eau) contenant un surfactant non-ionique provoque la formation d'une microémulsion qui génère après polymérisation des nanoparticules avec une matrice interne lipidique et une matrice externe polymérique (Al Khouri Fallouh et *al.*, 1986). Avec ce procédé, une efficacité d'encapsulation supérieure à 80% a été obtenue pour des principes actifs hydrophobes comme la cyclosporine (Bonduelle et *al.*, 1992) et l'indométacine (Ammoury et *al.*, 1991) comparativement à ce qui est obtenu avec les nanosphères. Cette technique a aussi été utilisée pour l'incorporation d'insuline, cependant l'efficacité était moindre de par 50%. Ces nanocapsules lorsqu'administrées par voie orale chez le rat diabétique, provoquent un effet hypoglycémiant durant 20 jours (Michel et *al.*, 1991; Damgé et *al.*, 1990; 1988). Afin d'incorporer des molécules hydrophiliques comme les peptides et les protéines dans les nanocapsules de PACA, plusieurs groupes ont développé des techniques se basant sur la polymérisation interfaciale mais avec une émulsion "eau dans huile" au lieu "huile dans eau" (Watanasirichaikul et *al.*, 2000; Gasco et *al.*, 1991; El Samaligy et *al.*, 1986). L'insuline incorporée dans ces nanocapsules à matrice interne hydrophilique offre une meilleure activité hypoglycémiant chez des rats diabétiques qu'une solution d'insuline libre en sous-cutané (Watanasirichaikul et *al.*, 2002).

#### **1.4.1.2 Micro- et nanoparticules obtenues à partir de polymères préformés**

Cette méthode évite l'utilisation dans le milieu de synthèse de molécules souvent toxiques tels les monomères ou bien encore les surfactants. De façon générale, les nano- et microparticules à base de polymères préformés sont synthétisées par précipitation ou dénaturation/solidification de polymères. Les polymères préformés utilisés sont des polymères synthétiques ou des macromolécules naturelles (Couvreur et *al.*, 1995).

##### **1.4.1.2.1 Macromolécules naturelles**

Scheffél et *al.* ont été parmi les premiers à produire des nanosphères à partir de macromolécules naturelles, en utilisant de l'albumine sérique humaine (Scheffél et *al.*,

1972). L'albumine a aussi été utilisée pour synthétiser des microsphères en présence de fines particules de magnétite. Les particules ainsi obtenues sont magnétiques et peuvent être ciblées *in vivo* vers un compartiment corporel spécifique par l'application sur la zone cible d'un champ magnétique (Gallo et *al.*, 1984; Widder et *al.*, 1979; Kramer, 1974). Ces nanosphères ont été obtenues par dénaturation thermique d'une émulsion d'albumine "eau dans huile". La procédure est simple mais nécessite l'emploi de grandes quantités d'huile ce qui rend difficile la récupération des nanosphères et ce procédé cause une thermodégradation de l'albumine. Lorsqu'une solution d'albumine est sonifiée, des microsphères contenant un fort pourcentage d'air sont obtenues. Ces microsphères d'albumine (Albumex®) sont employés actuellement comme agent de contraste en radiologie (Walday et *al.*, 1994). Par le même procédé, il est possible d'obtenir des nanoparticules d'albumine qui sont utilisés actuellement comme matrice de libération de paclitaxel. Ce produit est utilisé dans des études cliniques de Phase II pour le traitement des carcinomes de la tête et du cou chez l'humain (Damascelli et *al.*, 2000).

Pour éviter ces méthodes au potentiel dénaturant pour la macromolécule naturelle, un procédé de désolvatation/resolvatation a été proposé pour obtenir des nanoparticules en milieu aqueux (Weber et *al.*, 2000; Marty et *al.*, 1978). La méthode de désolvatation permet d'isoler des nanoparticules à base de macromolécules d'un milieu aqueux en favorisant leur précipitation par l'ajout de substances comme des sels d'ammonium ou de l'éthanol. La gélatine est obtenue par la dénaturation du collagène. Cette protéine dénaturée est employée dans la production de nanosphères. Celles-ci sont synthétisées à partir d'une solution aqueuse concentrée de gélatine à laquelle est ajoutée lentement un agent désolvatateur (éthanol ou un sel neutre) qui déshydrate la gélatine, induisant une modification de la structure tertiaire qui conduit à l'aggrégation des protéines. Les protéines formant les nanoparticules sont réticulées par la glutaraldéhyde après réhydratation partielle des aggrégats (Marty et *al.*, 1978). En raison du caractère nocif du glutaraldéhyde, le D,L-glycéraldéhyde est maintenant utilisé comme agent de réticulation car moins toxique (Vandelli et *al.*, 2001). D'origine naturelle et très disponible, la gélatine permet l'obtention d'un biomatériau dont les applications vont se multiplier dans l'avenir et elle trouvera sa niche dans les technologies de la libération contrôlée de médicaments.

Les microsphères de gélatine ont aussi été proposées 1) comme support pour la culture cellulaire (Altankov et *al.*, 1991) 2) comme vecteurs pour le dipeptide muramyl, un agent induisant *in vivo* une activité anti-tumorale (Tabata et Ikada, 1987), et pour le PS1, un complexe polysaccharidique dérivé de *Mycobacterium bovis*, ayant une activité anti-tumorale similaire (Lou et *al.*, 1994). Ces microparticules possèdent aussi des propriétés mucoadhésives qui permettent d'utiliser ces microparticules pour la libération contrôlée de l'amoxicilline, un antibiotique utilisé pour l'éradication de *Helicobacter pylori* qui est une bactérie spiralée résidant dans l'estomac et qui est la principale cause d'ulcères gastriques (Wang et *al.*, 2001; 2000). De plus, une activité immunostimulatoire non spécifique a été observée suite à l'injection de microparticules de gélatine. Cette activité serait liée à la capacité des microparticules de lier la fibronectine (Farrugia et Groves, 1999). En thérapie génique, ces microparticules démontrent des taux de transfection supérieures et plus prolongées que le produit commercial, Lipofectamine® (Truong-Le et *al.*, 1998). De plus, les microsphères de gélatine contenant du facteur basique de croissance de fibroblastes (bFGF) permettent une néovascularisation au site d'injection sous-cutané chez la souris (Tabata et Ikada, 1999). Pour le traitement de l'ostéoporose, des microsphères de gélatine dans lesquelles la calcitonine a été incorporée sont en développement. La calcitonine est un peptide qui favorise l'absorption du calcium au niveau osseux. Les résultats obtenus montrent un effet hypocalcémique marqué au niveau du sang indépendamment de la voie d'administration employée (pulmonaire, nasale ou intramusculaire). Un effet encore plus marqué est observé lorsque les microsphères de gélatine ayant une charge positive en surface sont utilisées (Morimoto et *al.*, 2001; 2000).

Le chitosan est un polysaccharide cationique de haute masse moléculaire obtenu par désacétylation de la chitine qui compose l'exosquelette des crustacés. C'est une substance non-toxique, employée comme excipient dans plusieurs formulations pharmaceutiques. Le chitosan possède de plus, *in vivo*, des propriétés mucoadhésives (Illum et *al.*, 1994). Les microsphères de chitosan sont obtenues par la technique de coacervation qui consiste en une séparation de phase du polymère par modification d'un paramètre physicochimique (température, pH) du milieu. Le chitosan est dissout dans de l'acide acétique et est injecté sous pression par de l'air comprimé dans une solution

d'hydroxyde de sodium (NaOH) dans laquelle, il précipite (Nishimura et *al.*, 1986). Les microsphères ainsi obtenues sont employées dans de nombreuses applications notamment pour l'immobilisation d'enzymes (Hayashi et Ikada, 1991), comme vecteur de libération d'agents anti-cancéreux (Nishimura et *al.*, 1986) ou de peptides thérapeutiques comme la gosereline, utilisée dans le traitement de l'endométriose (Illum et *al.*, 2000). Les propriétés mucoadhésives des microsphères de chitosan, leur confère un temps de résidence très long dans les tissus mucosaux (intestin, cavité nasale etc...) ce qui permet une libération prolongée des principes actifs incorporés dans ces microsphères. Ceci explique le choix de ce biopolymère pour la conception de microsphères pour l'administration par voie nasale d'insuline (Fernandez-Urrusuno et *al.*, 1999) et de vaccins (Van der Lubben et *al.*, 2001) ou pour l'administration par voie orale d'agents anti-*Helicobacter pylori* (Shah et *al.*, 1999). Les microsphères natives de chitosan ont montré d'excellentes propriétés cicatrisantes chez le rat, ce qui permettrait leur emploi pour le remodelage de tissus et pour le traitement des grands brûlés (Conti et *al.*, 2000).

Un autre polysaccharide couramment utilisé est l'alginate qui origine de l'algue brune. La fabrication de microparticules à base d'alginate se fait par précipitation de l'alginate en présence de calcium. L'ajout de poly-L-lysine au cours de la synthèse permet de solidifier les microparticules d'alginate tout en augmentant l'hydrophilicité de surface (Rajaonarivony et *al.*, 1993). Les applications des microsphères d'alginate sont très variées : matériel de chromatographie d'affinité pour la purification des isoenzymes de l'alpha-amylase (Roy et *al.*, 2000), matrice pour l'immobilisation de l'invertase (Arruda et Vitolo, 1999), vecteurs de transport et de libération contrôlée pour les oligonucléotides antisens (Aynie et *al.*, 1999) ou l'insuline (Jerry et *al.*, 2001). Plus spécifiquement, on peut noter l'expérimentation chez la souris modèle de microsphères d'alginate liées avec l'interleukine-10 (IL-10) pour le traitement de l'inflammation chronique du gros intestin. Durant ce traitement, il y a diminution des niveaux de l'ARN messager de l'IL-12 ainsi qu'une diminution de l'expression de la molécule de surface CD40 sur les cellules Mac-1 positives (macrophages). IL-10 lié à l'alginate permet une diminution plus importante de l'inflammation que IL-10 libre (Nakase et *al.*, 2002). La biodégradabilité et la biocompatibilité de l'alginate font de ce polymère, un polymère naturel de choix pour des applications aussi variées que la préparation de vaccins oraux

permettant une induction d'une réponse systémique et mucosale (Cho et *al.*, 1998) que pour la transfection de cellules tumorales par des adénovirus recombinants (Kalyanasundaram et *al.*, 1999). Dans un domaine particulièrement sensible de la recherche biomédicale soit l'ingénierie tissulaire, ce biomatériau est utilisé comme support pour la croissance de divers types cellulaires. A titre d'exemple, des chondrocytes, provenant du cartilage nasal d'un fœtus de rat, cultivés sur des microsphères d'alginate, généraient après 20 jours, une structure cartilagineuse calcifiée (Loty et *al.*, 1998).

#### **1.4.1.2.2. Macromolécules synthétiques**

En 1981, Gurny et *al.* ont préparé les premières nanosphères de D,L- acide poly(lactique) (D,L-PLA) en y incorporant de la testostérone par une technique d'évaporation/émulsion. Cette technique consiste à dissoudre le polymère dans un solvant chloré (chloroforme, chlorure de méthylène) et à émulsifier le mélange dans une phase aqueuse contenant un surfactant. Par la suite, le solvant organique est éliminé par évaporation sous pression atmosphérique réduite (Gurny et *al.*, 1981). Une seconde technique dite "salting out" a été développée et elle permet d'éviter l'utilisation des solvants chlorés et des surfactants. La méthode consiste à ajouter, sous agitation, au polymère dissous dans l'acétone, une solution aqueuse saturée en électrolytes et contenant du poly(vinyl alcool) pour augmenter la viscosité et stabiliser la phase organique afin d'obtenir une émulsion d'huile dans l'eau. Par la suite, de l'eau est ajoutée jusqu'à l'obtention de nanosphères par insolubilisation du polymère. Différents polymères peuvent être utilisés avec cette technique, comme l'acide poly(lactique) et ses dérivés et les copolymères d'acide méthacrylique (Bindschaedler et *al.*, 1990).

Le PLA et ses dérivés (PLGA) ont l'avantage d'être biodégradables; ils sont métabolisés et transformés en acide lactique et glycolique. De plus, la majorité des études effectuées à ce jour, démontrent la biocompatibilité des microsphères et nanoparticules de PLA et PGLA et l'absence de réactions indésirables locales ou systémiques lors d'applications thérapeutiques *in vivo* (Anderson et Shive, 1997). Ces polymères ont été aussi utilisés comme implants médicaux (Kulkarni et *al.*, 1966). Depuis la dernière décennie, plusieurs systèmes thérapeutiques de libération contrôlés à base de PLA ou



PLGA ont été développés comme le Zoladex<sup>®</sup> (implant), le Decapeptyl<sup>®</sup> et l'Enantone<sup>®</sup> (microsphères) employés pour le traitement du cancer de la prostate (Gurny et *al.*, 1993). Le PLA et PLGA sont les deux polymères les plus employés actuellement pour l'encapsulation de peptides et de protéines. Leur popularité s'explique par plusieurs facteurs. Premièrement, ces polymères sont approuvés par le FDA (Food and Drug Agency, USA) pour ces utilisations. Deuxièmement, ils permettent une libération non-fickienne (la fraction de médicament libérée n'est pas fonction de la racine carrée du temps) des principes actifs incorporés. La libération de principe actif est dépendante de la dégradation de la matrice. Troisièmement, le procédé de synthèse se fait par évaporation de solvant et n'affecte pas l'activité biologique des peptides et protéines à encapsuler (Couvreur et Puisieux, 1993). La versatilité de PLA et de PLGA s'est accrue par la synthèse de copolymères de PLA-PEG et PLGA-PEG qui entrent dans la composition de nanoparticules de type Stealth. Ces formulations se révèlent fort utiles pour prolonger le temps de circulation dans le sang de nanoparticules administrées par voie parentérale (Li et *al.*, 2001; Panagi et *al.*, 2001). Plusieurs autres applications des particules de PLA et de PLGA ont vu le jour, telle la conception de vaccins (Jung et *al.*, 2001), de vecteurs de plasmides pour la thérapie génique (Perez et *al.*, 2001) ou bien encore de transport de principes actifs utilisés en neuro-oncologie (Benoit et *al.*, 2000).

Les premières microcapsules étaient à base d'éthyle de cellulose, un dérivé chimique de la cellulose, et la méthode de synthèse utilisée est une coacervation. Cette technique consiste à induire une perte de solubilité du polymère en abaissant la température du mélange. Les microcapsules isolées par filtration ont alors un diamètre variant entre 175 et 275  $\mu\text{m}$  (Kato et *al.*, 1981). Parmi les principes actifs incorporés dans ces microcapsules, on peut entre autres noter le FK906, un inhibiteur tripeptidique de la rénine (Weiss et *al.*, 1998) et aussi la mitomycine C (Kato et *al.*, 1981). Cependant les microcapsules d'éthyle de cellulose étant non biodégradables, leur utilisation *in vivo* s'est restreinte à la chimioembolisation. Des études cliniques ont démontré une diminution de la taille des tumeurs rénales chez 80% des patients traités par chimioembolisation avec des microcapsules d'éthyle de cellulose incorporant de la mitomycine C (Nemoto et *al.*, 1981). Une étude italienne d'une durée de trois ans a montré que la chimioembolisation avec des microcapsules contenant de la mitomycine C induisait une réponse favorable

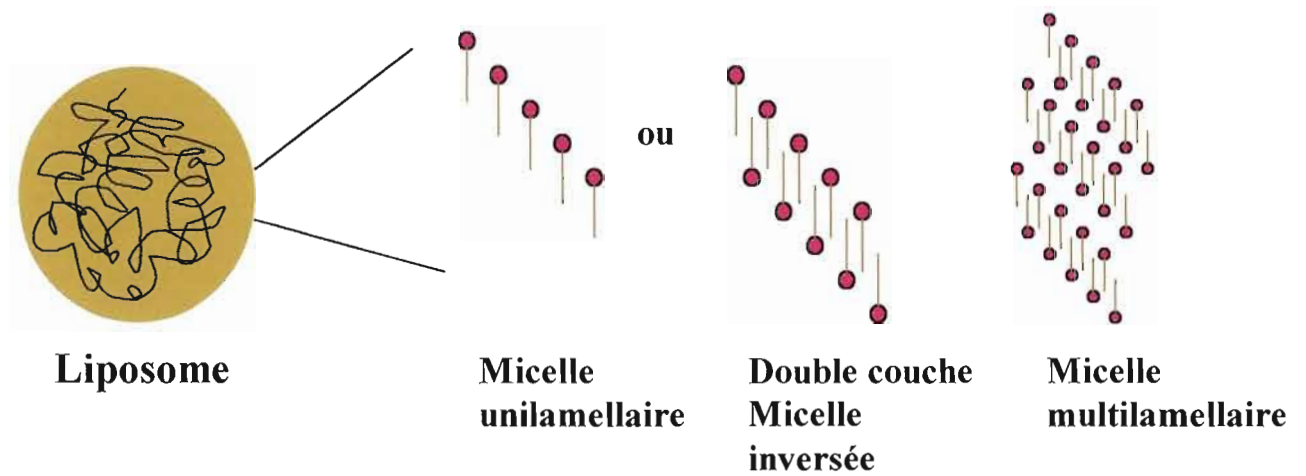
chez 43% des patients porteurs d'un hépatocarcinome non opérable en plus d'améliorer sensiblement leur qualité de vie (Aداusio et *al.*, 1990).

### 1.4.2 Liposomes

Les liposomes ont été introduits dans les années 1960 comme modèle pour l'étude de membranes cellulaires (Bangham et *al.*, 1965). Ils sont formés par l'assemblage spontané de phospholipides en milieu aqueux. La vésicule lipidique est formée d'une bicouche de phospholipides et possède un compartiment central aqueux (Figure 3). Cette sphère lipidique incorpore dans son compartiment aqueux central soit des médicaments hydrophiles, soit liposolubles si associés à des cyclodextrines, ou bien des médicaments lipophiles directement dans la bicouche lipidique (Mc Cormack et Gregoriadis, 1994). Les principaux types de médicaments transportés par les liposomes servent au traitement d'infections bactériennes et des tumeurs; ou bien encore, ils servent comme vecteurs d'antigènes pour la vaccination (Lasic, 1998).

La clairance rapide des liposomes suite à leur injection intraveineuse a dû être résolue afin d'obtenir une bonne efficacité thérapeutique des liposomes. Malgré leur biomimétisme avec la membrane cellulaire, les liposomes sont reconnus comme des particules étrangères et sont rapidement opsonisés et capturés du sang par les macrophages du foie. La liaison covalente à la surface des liposomes de monosialogangliosides (Gabizon et Papahadjopoulos, 1994) ou de poly(oxyéthylène) (POE) (Blume et Cevc, 1990), a permis une diminution de l'adsorption des protéines plasmatiques ou d'opsonines, retardant leur capture par les macrophages (Senior et *al.*, 1991).

Les liposomes avec du POE en surface sont dits "Stealth" ou invisibles à cause de leur temps de résidence élevé dans la circulation sanguine. Des liposomes Stealth sont aussi obtenus par l'incorporation de cholestérol (Kirby and Gregoriadis, 1983) ou de phosphatidyle choline stéarique (Forssen et *al.*, 1992) dans les liposomes. Les liposomes Stealth ont une taille d'environ 100nm. Ils ciblent de manière passive les tumeurs par extravasation dans l'espace extracellulaire suite à leur injection en intraveineuse.



**Figure 3:** Liposome et les divers modes d'association des lipides formant la couche lipidique de surface. Adapté de Lasic D.D. (1998) *Trends Biotech.* **16**, 307-321.

Ceci est possible à cause de la perméabilité anormalement élevée des vaisseaux sanguins irriguant la tumeur. Des anticorps spécifiques aux antigènes des cellules cancéreuses ont été aussi greffés à la surface des liposomes pour en augmenter le ciblage (Huwylar et *al.*, 1997). D'autres approches utilisent des liposomes thermosensibles qui libèrent leur contenu à des températures élevées suivant un traitement d'hyperthermie localisée (Van Bree et *al.*, 1996).

Chez un modèle murin, les liposomes Stealth/doxorubicine ont démontré un temps de demi-vie sanguin de 15.3h et se sont accumulés par extravasation aux sites des tumeurs (Papahadjopoulos et *al.*, 1991). Elles ont permis une meilleure activité anti-cancéreuse du médicament lorsque comparée à la forme libre de la doxorubicine (Vaage et *al.*, 1992). Chez les humains, les liposomes contenant de la doxorubicine s'accumulent dans les lésions du sarcome de Kaposi et induisent une très bonne réponse thérapeutique (Sturzl et *al.*, 1994) alors que chez des personnes atteintes de gliosarcomes, ils induisent une stabilisation à long terme de la maladie chez 54% des patients traités (Fabel et *al.*, 2001). Les produits thérapeutiques à base de liposomes disponibles sur le marché ou en phase de développement se retrouvent au Tableau III.

La formulation liposomale d'amphotéricine B (Ambisome) pour le traitement d'infections fongiques réduit la toxicité rénale associée à l'amphotéricine B, par contre, à doses élevées, la néphrotoxicité réapparaît (Longuet et *al.*, 1991). Lors d'infection à *Leishmania*, le parasite infecte les macrophages, ainsi l'Ambisome peut être utilisé car les liposomes non Stealth sont rapidement phagocytés permettant à l'amphotéricine des liposomes d'être libérée à l'intérieur des macrophages infectés (Davidson et *al.*, 1991).

Des résultats prometteurs avec une formulation liposomale de tobramycine ont été obtenus pour le traitement d'infection à *Pseudomonas aeruginosa* chez les personnes atteintes de fibrose kystique. La formulation liposomale administrée par voie pulmonaire montre une efficacité comparable à l'antibiotique libre mais requiert des concentrations moins élevées ce qui diminue les risques de toxicité systémique reliés à la tobramycine (Beaulac et *al.*, 1996).

**Tableau III** : Formulations liposomales disponibles sur le marché ou rendu en études cliniques.

Produit	Principe actif	Composition en lipides	Usage	Statut
Daunoxom	Daunorubicine	DSPC / Ch	Anticancéreux	Commercialisé
Doxil	Doxorubicine	DSPE / PC / Ch	Anticancéreux	Commercialisé
Ambisome	Amphotéricine	DPPC / Ch	Antibiotique	Commercialisé
Mikasome	Amykacine	PC/ Ch / DSPG	Antibiotique	Phase II/III
Oncolipin	Interleukine-2	DMPC	Anticancéreux	Phase I
Epaxal	Protéines hépatite A	PC / PE	Vaccin	Commercialisé
Spy07	Cisplatine	Ch / PC / DSPE	Anticancéreux	Phase II

Adapté de Barratt G.M. (2000) *PSIT* **3**, 163-171.

DSPC : Distéaroyle phosphatidyle choline. Ch : Cholestérol. DSPE : Distéaroyle phosphatidyle éthanolamine. PC : Phosphatidyle choline. DPPC : Dipalmitoyle phosphatidyle choline. DSPG : Distéaroyle phosphatidyle glycérol. DMPC : Dimyristoyl phosphatidyle choline.

Les liposomes Stealth ayant un temps de circulation sanguine plus élevé dû aux chaînes de PEO à leur surface, ont plus de chance de voir leur anticorps réagir avec l'antigène cible, que si des liposomes non Stealth sont utilisées. Des expériences de ciblage des immunoliposomes ont fait ressortir que la densité du PEO à la surface du liposome devrait être entre 4 et 10% mol afin de maximiser le temps de circulation et que la masse moléculaire du PEO ne devrait pas être supérieure à 2000Da pour éviter que l'anticorps soit masqué (Torchilin et *al.*, 1994c; Mori et *al.*, 1991). L'effet de masquage par le PEO est contourné si l'anticorps est attaché à la partie distale du polymère (Maruyama et *al.*, 1998). Cependant, la réponse immune de l'hôte à l'anticorps hétérologue est aussi augmentée (Harding et *al.*, 1997). Des anticorps spécifiques pour la myosine intracellulaire de cellules cardiaques ischémiques ou nécrotiques ont été greffés à la surface de liposomes Stealth pour cibler chez le lapin les zones d'infarctus. Cet anticorps ne lie pas la myosine des cardiomyocytes sains (Torchilin et *al.*, 1994c). La formulation liposomale non Stealth d'interleukine-2 est utilisée pour le ciblage d'immunosuppresseurs toxiques aux cellules T impliqués dans le rejet de greffe (Konigsberg et *al.*, 1998).

Il est à noter que lorsque des anticorps sont greffés en surface de liposomes pour la chimiothérapie du cancer, leur efficacité anti-cancéreuse n'est pas toujours augmentée. Effectivement, il est fort possible que ces immunoliposomes n'exercent leur action qu'en périphérie de la tumeur et ne peuvent atteindre les zones profondes de la tumeur (Forssen et Willis, 1998).

Les liposomes ont été utilisés avec succès pour le transport intracellulaire de l'ADN. La formulation la plus employée est à base de lipides cationiques qui forment un complexe avec les molécules d'ADN permettant d'obtenir un bon niveau de transfection. Les maladies ciblées par cette technologie sont différents types de cancers, l'artériosclérose, la fibrose cystique et l'hémophilie. A titre d'exemple, l'administration d'une formulation liposomale cationique du gène de l'interleukine-2 augmente l'activité anti-tumorale de cette cytokine dans des xénogreffes tumorales humaines implantées chez la souris (Egilmez et *al.*, 1996). De plus, une étude de phase clinique I a démontré l'efficacité de liposomes cationiques à transfecter le gène E1A chez des patients atteints de cancers de l'ovaire et du sein. Chez les patients traités, les tumeurs ont présenté une

apoptose accrue et une prolifération moindre que chez les patients contrôles (Hortobagyi et *al.*, 2001). A cause de la complexité inhérente à la thérapie génique, le développement de formulations liposomales à des fins thérapeutiques est une tâche parsemée de difficultés mais prometteuse.

### 1.4.3 Nanoparticules solides lipidiques (SLN)

Introduites en 1991, les nanoparticules solides lipidiques (SLN) se présentent comme une alternative aux nanoparticules polymériques et aux liposomes. Elles sont produites par homogénéisation à haute pression de lipides naturels (mono-, di-, triglycérides, palmitate de cétyle) fondus et dispersés dans l'eau à haute température. Ces SLN peuvent être synthétisées sur une échelle industrielle et lorsque stabilisées en présence de lécithine, elles sont stérilisables par autoclave (Couvreur et *al.*, 1995). Les SLN combinent les avantages des nanoparticules polymériques et des liposomes. Elles procurent une matrice solide et stable pour la libération contrôlée de médicaments et ont une faible toxicité (Schöler et *al.*, 2000). Cependant, à cause de leur faible hydrophilicité et des éléments utilisés pour leur synthèse, l'incorporation de peptides et de protéines y est impossible. Par contre, il est possible d'obtenir des complexes stables d'ADN/SLN cationiques, qui sont peu cytotoxiques et qui ont un très bon taux de transfection *in vitro* chez les cellules Cos-1 (Olbrich et *al.*, 2001). Des SLN, dans lesquelles de la doxorubicine a été incorporée, ont été injectées par voie intraveineuse chez le rat. Vingt-quatre heures suivant l'injection, la doxorubicine était toujours détectée dans le sang et sa concentration dans les tissus sains, à l'exception du cerveau, était inférieure à celle observée lorsque la doxorubicine libre est injectée. De plus, l'incorporation de la doxorubicine dans les SLN diminue significativement sa cardiotoxicité (Fundaro et *al.*, 2000). De par leur nature lipidique, les SLN possèdent aussi des propriétés recherchées pour la cosmétologie. Elles augmentent la perméation transcutanée des substances incorporées dans leur matrice (Maia et *al.*, 2000) et elles possèdent des propriétés occlusives qui permettent de réguler l'hydratation de la peau (Jenning et *al.*, 2000). Une meilleure caractérisation de ces nanoparticules s'impose avant leur utilisation chez l'humain même si les SLN *in vivo* sont beaucoup moins cytotoxiques que les microparticules à base de poly(lactide) ou de poly(butylcyanoacrylate) (Muller et *al.*,

1996). Récemment, il a été mis en évidence en incubant des macrophages murins avec différentes SLN que la cytotoxicité des SLN dépendait de la nature des lipides et de la quantité de nanoparticules (Schöler et *al.*, 2002).

#### 1.4.4 Micelles

Les micelles résultent de l'association spontanée de molécules amphiphiliques (phospholipides, surfactants, polymères) dans le but de soustraire la partie hydrophobique de la molécule à l'environnement aqueux (Figure 4). Cette association se produit à une concentration spécifique, dite concentration micellaire critique (CMC). Les micelles à base de surfactants non-ioniques ou niosomes, principalement utilisés dans l'industrie pharmaceutique, ont une distribution de l'eau dans leur structure de type anisotropique, car la concentration de l'eau dans le niosome diminue de la surface externe vers l'intérieur de la micelle. A cause de cette anisotropie, les micelles possèdent un gradient de polarité de la surface externe hautement hydratée vers l'intérieur à caractère très hydrophobe. La distribution spatiale d'un médicament dans cette micelle sera fonction de sa polarité (Figure 4). Ainsi, une molécule non polaire sera située dans la partie hydrophobique centrale alors qu'une molécule polaire se retrouvera dans la partie hydratée périphérique (Torchilin, 2001). L'encapsulation d'agents anti-cancéreux comme le méthotrexate et la doxorubicine dans des niosomes augmente leur activité et leur libération au niveau de la tumeur (Chandraprakash et *al.*, 1993; Rogerson et *al.*, 1988). Les niosomes trouvent d'autres applications comme vecteurs d'agents de contraste en imagerie médicale (Muller et *al.*, 2000), d'agents anti-parasitaires pour le traitement de la leishmaniose (Sinha et *al.*, 2002) ou comme matrice à libération de peptides à action rapide tel que le LHRH (luteinizing hormone releasing factor) (Arunothayanun, 1999). Ces vecteurs se révèlent aussi de puissants adjuvants qui augmentent la réponse immunitaire humorale et cellulaire lorsqu'un antigène est incorporé dans leur structure (Brewer et Alexander, 1992).

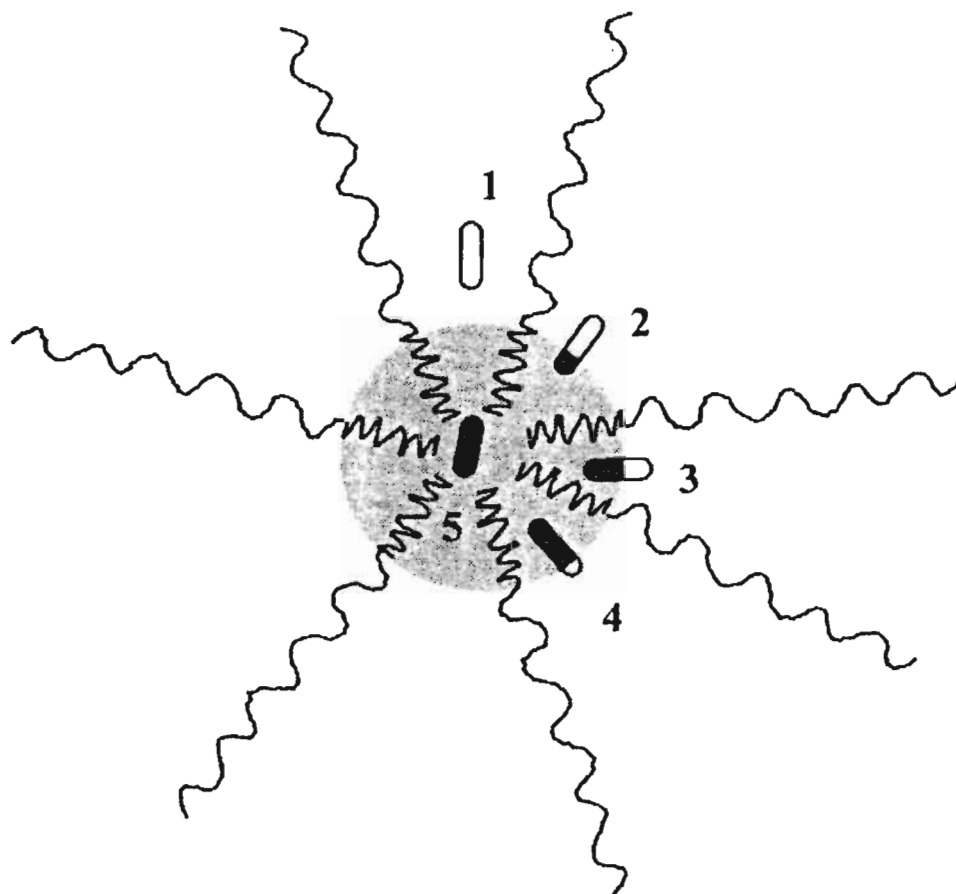
Les micelles synthétisées à partir de surfactants de faibles poids moléculaires ne sont pas thermodynamiquement stables et se dissocient en milieu aqueux. La nécessité de systèmes micellaires plus stables a orienté les recherches vers les micelles de nature polymérique. Ces dernières sont à base de copolymères consistant d'unités



monomériques hydrophiliques et hydrophobiques en alternance de type AB (A : unité hydrophilique; B : unité hydrophobique), dans lesquels la longueur de l'unité hydrophilique est légèrement plus grande que celle de l'unité hydrophobique (Torchilin, 2001). Comme pour les micelles à base de surfactants, la formation de micelles polymériques résulte de la diminution de l'énergie libre obtenue par l'association des unités hydrophobiques entre elles afin de réduire le contact avec l'environnement aqueux (Jones et Leroux, 1999).

D'un point de vue pharmacologique, les copolymères à base de deux unités [oxyde de poly(éthylène)-b-poly(styrène); oxyde de poly(éthylène)-b-poly(D,L-lactide)] et de trois unités [oxyde de poly(éthylène)-b-oxyde de poly(propylène)-b-oxyde de poly(éthylène); oxyde de poly(éthylène)-b-poly(isoprène)-b-oxyde de poly(éthylène)] sont d'un intérêt particulier. Les chaînes d'oxyde de poly(éthylène) présentes dans ces polymères, stabilisent la micelle en augmentant l'hydratation et en lui offrant une protection stérique. (Kwon et Kataoka, 1995). Les micelles polymériques se distinguent des autres vecteurs particuliers par un diamètre se situant entre 10 et 100nm et par la présence d'un compartiment intérieur hydrophobique (Torchilin, 2001).

Les premières études *in vivo* avec des micelles polymériques ont été réalisées par Yokoyama et *al.* en 1990, qui utilisèrent des micelles à base de copolymères de poly(éthylène glycol) et poly(acide aspartique) auxquels était lié covalamment l'adriamycine (Yokoyama et *al.*, 1990). Ces micelles étaient très stables *in vivo* et leur temps de circulation sanguine et leur biodistribution après injection intraveineuse, dépendaient de la taille relative des segments de poly(éthylène glycol). Effectivement, plus la chaîne de poly(éthylène) était longue, plus le temps de circulation était augmentée et plus la phagocytose était diminuée (Kwon et Kataoka, 1995). Il a été démontré que l'ADN de plasmide et des oligonucléotides antisens pouvaient s'assembler sous forme de micelles en présence du copolymère PEG-b-poly(L-lysine) via des interactions électrostatiques. L'ADN ainsi complexé était très résistant à l'action des nucléases (Katayose et Kataoka, 1998).

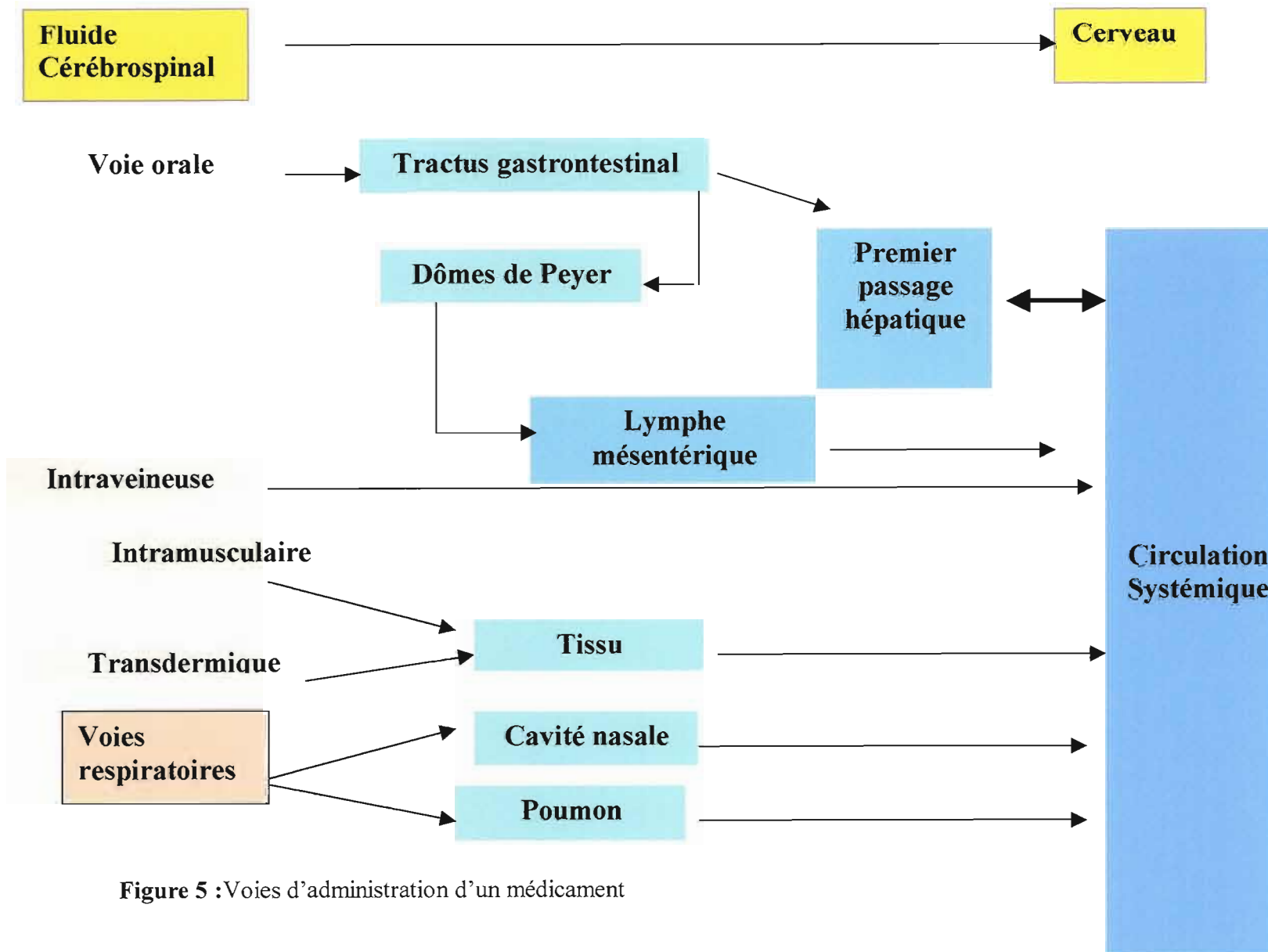


**Figure 4 :** Distribution d'un principe actif dans une micelle en fonction de son hydrophobicité (la région noire indique l'hydrophobicité alors que la région blanche est hydrophile). Les médicaments très hydrophiles se retrouvent dans la partie externe de la micelle (cas 1); alors que ceux qui sont hydrophobes se retrouvent dans la partie interne (cas 5). Les principes actifs avec un rapport hydrophobicité/hydrophilicité intermédiaire se retrouvent à des positions intermédiaires dans la micelle (cas 2-4). Tiré de Torchilin V.P. (2001) *J. Control. Release* **73**, 137-172.

Les micelles polymériques ont un avenir prometteur en immunologie appliquée à cause des propriétés adjuvantes des copolymères entrant dans leur composition. A cet effet, des copolymères non-ioniques comme les Pluronic, composés de trois blocs poly(éthylène glycol)-oxyde de poly(propylène)-poly(éthylène glycol) sont employés. L'activité adjuvante est accrue avec l'augmentation de la longueur de la chaîne d'oxyde de poly(propylène) et cette propriété permet de moduler l'amplitude de la réponse immune au vaccin. Ainsi, une forte activité adjuvante a été obtenue avec des micelles à base de Pluronic contenant des chaînes de poly(propylène) de 10,000Da et incorporant un antigène du virus de l'influenza. La réponse immune observée était de type cellulaire Th2 avec les micelles hydrophiliques et de type mixte Th1/Th2 lorsque des micelles plus hydrophobes étaient employés (Todd et *al.*, 1998). La faible toxicité et la capacité à moduler la réponse immunitaire font des micelles à base de Pluronic un matériau idéal pour le développement de vaccins (Triozi et *al.*, 1997).

### **1.5 Voies d'administration**

L'un des facteurs les plus importants influençant l'efficacité d'un principe actif est sa voie d'administration comme l'illustre la Figure 5. Avant de sélectionner une voie d'administration particulière, plusieurs paramètres doivent être pris en compte comme la stabilité du médicament par cette voie, la durée de la phase d'absorption et de l'action thérapeutique, la vitesse de clairance etc... . Comme pour la posologie conventionnelle, la voie d'administration du principe actif aura un impact significatif sur la libération contrôlée de principes actifs. Les voies d'administration les plus utilisées sont les voies parentérale et orale, la voie transdermale ayant une utilisation limitée à certains médicaments. Les percées en biopharmaceutiques ont augmenté le nombre de peptides et de protéines ayant des applications thérapeutiques importantes. Ces médicaments, de par leurs propriétés biochimiques particulières, requièrent des voies spécifiques d'administration.



**Figure 5 :** Voies d'administration d'un médicament

Ainsi, les voies nasale et pulmonaire, qui dans le passé avaient été négligées, sont considérées comme voie d'administration pour les peptides et les protéines (Davis, 1997). Une brève description des caractéristiques anatomiques, des avantages et désavantages pour la libération contrôlée, quelques exemples d'applications et les tendances pour les années futures seront donnés dans les pages suivantes pour chacune des voies d'administration.

### **1.5.1 Voie orale**

Elle est de loin la voie la plus utilisée à ce jour, dû à la facilité d'administration. Cette voie consiste en l'administration par la bouche, d'un principe actif dont l'absorption se produit au niveau du tractus gastro-intestinal, principalement au niveau de l'iléon, cependant sa biodisponibilité peut être réduite à cause du premier passage hépatique (Gomez-Orellana et Patton, 1998). On désigne par premier passage hépatique (metabolic first pass) toute transformation d'un principe actif au niveau du foie avant son passage dans la circulation générale par la veine cave.

#### **1.5.1.1 Physiologie gastro-intestinale**

L'absorption au niveau de la bouche est faible à cause du temps de résidence très court et de la faible surface de l'épithélium multilamellaire buccal ( $0.02\text{m}^2$ ). L'absorption est faible au niveau de l'estomac et du côlon pour la majorité des médicaments. L'intestin grêle grâce à sa surface d'absorption importante ( $200\text{-}400\text{m}^2$ ), est le site majeur pour l'absorption d'une substance thérapeutique (Cardot, 1997). L'intestin est le lieu d'absorption des divers nutriments et électrolytes et il agit simultanément comme une barrière sélective entre l'environnement et la circulation systémique empêchant le mélange du contenu de l'intestin avec les fluides vasculaires et interstitiels (Thomas et al., 1996; Ma et al., 1991). Sa structure est relativement similaire de l'estomac à l'anus et elle se compose d'une monocouche de cellules épithéliales qui recouvre la surface luminale. Entre les cellules épithéliales s'intercalent des cellules spécialisées (cellules goblets, cellules endocrines, cellules M). La coordination de l'absorption et de la digestion s'accomplit par l'intermédiaire de structures présentes tout le long de l'intestin

(glandes gastriques, villosités, microvillosités et cryptes). La couche de cellules épithéliales recouvre une région de tissu conjonctif assez lâche, le lamina propria, contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques et une variété de types cellulaires (lymphocytes et éosinophiles) (Yeh et *al.*, 1998).

#### 1.5.1.2 Barrières anatomiques et physiologiques

Malgré sa popularité, la voie orale présente un ensemble de barrières morphologiques et physiologiques qui s'opposent à l'absorption intestinale. La barrière anatomique est représentée par la muqueuse intestinale qui s'oppose au passage de molécules de hauts poids moléculaires mais elle demeure cependant une barrière incomplète. Les macromolécules et les matériaux particuliers peuvent pénétrer la muqueuse en plusieurs endroits incluant les extrémités des villosités, entre les entérocytes ou via des régions lymphoïdes spécialisées (dômes de Meyer) (Norris et *al.*, 1998).

La couche de mucus qui recouvre l'épithélium intestinal agit aussi comme une barrière à l'absorption : sa viscosité et ses propriétés de gel ralentissent la diffusion de plusieurs macromolécules comme la glucose oxydase (186kDa), l'albumine sérique de boeuf (68kDa) et la lysozyme (14.4kDa) (Desai et *al.*, 1992, 1991, 1986). Le coefficient de diffusion obtenu dans le mucus est de 3 à 7% de celui observé dans du tampon. Le mucus protège la muqueuse gastro-intestinale contre les bactéries, les pathogènes ou les substances chimiques toxiques (Lamont, 1992) et elle maintient une différence de pH entre le lumen de l'intestin et la surface de la muqueuse (Lichtenberger, 1995). L'épaisseur du mucus varie entre 50 et 500µm le long du tractus gastro-intestinal. La composante principale du mucus est la mucine, une glycoprotéine hautement hétérogène de 1-2kDa (Strous et *al.*, 1992). Le mucus est non seulement un obstacle diffusionnel mais aussi physique à l'absorption de particules. Il favorise l'agréation de ces dernières ce qui résulte en une augmentation de leur taille entraînant une diminution de leur vitesse de diffusion (Aprahamian et *al.*, 1987). D'autres facteurs contribuent à diminuer la perméabilité des particules à travers le mucus comme la taille des particules et les interactions hydrophobiques mucus-particules. Norris et Sinko ont démontré avec des particules de polystyrène qu'au delà de 0.5µm de diamètre, ces particules ne pouvaient être transloquées à travers le mucus (Norris et Sinko, 1997). Des interactions

hydrophobiques non-spécifiques peuvent s'établir entre les extrémités carbohydrates des molécules de mucine et les polymères composant les microparticules similaires à celles qui se font avec les lectines de surface des bactéries pathogènes (Mantle et *al.*, 1994). Ainsi, la perméabilité à travers le mucus, de micropshères de polystyrène de 0.2µm de diamètre dont la surface a été modifiée par l'adsorption de surfactants de poloxamères, diminue lorsque l'hydrophobicité du surfactant augmente (Norris et Sinko, 1997).

De manière générale, dans les conditions physiologiques normales, une petite fraction seulement des protéines administrées par voie orale sont absorbées intactes par le tractus gastro-intestinal. Elles sont en majorité hydrolysées par l'action des protéases présentes dans l'estomac (pepsine) et dans l'intestin (trypsine, chymotrypsine, élastase et carboxypeptidase A). Ces enzymes protéolytiques se retrouvent aussi bien dans le lumen que dans la muqueuse intestinale (Gomez-Orellana et Patton, 1998).

### 1.5.1.3 Absorption gastro-intestinale

Bien que l'absorption de grosses microparticules à travers la muqueuse cellulaire ait été considéré comme impossible, il est maintenant généralement admis que les microparticules peuvent traverser cette barrière (Mc Minn et *al.*, 1996; Jepson et *al.*, 1996; Damgé et *al.*, 1996; Simon et *al.*, 1995; Florence et *al.*, 1995). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette absorption : transport paracellulaire, transport transcellulaire et absorption par les dômes de Peyer.

Le transport paracellulaire proposé par Volkenheimer en 1968 (Volkenheimer, 1968) n'est pas possible pour des particules, mais serait applicable pour des molécules de faibles masses moléculaires et relativement hydrophiles. Il est admis que cette voie n'est utilisable que par des molécules dont le rayon de giration est inférieur à 11.5 angstroms (Ma, 1991; Madara, 1989; Hollander 1988). La taille des pores des jonctions serrées (tight junctions) n'est que de 0.8nm dans l'iléon humain ce qui exclut toute contribution significative du transport paracellulaire à l'absorption intestinale des protéines et des peptides (Powell, 1981).

Le transport transcellulaire se produit soit par pinocytose pour les macromolécules (Smith et *al.*, 1992) soit par phagocytose pour les particules (Hillery, 1994; Jepson, 1993). La majeure partie de l'endocytose se produit au niveau de tissus lymphoïdes

spécialisés de l'intestin dits dômes de Peyer et qui contiennent des cellules membranaires M distribuées sur toute la longueur de l'intestin.

Les dômes de Peyer sont des amas de follicules lymphoïdes séparés du lumen intestinal par une seule couche spécialisée d'épithélium contenant des cellules M et des entérocytes. Sous les cellules M, on retrouve une poche spéciale contenant des cellules immunes (lymphocytes et macrophages). Ces dômes jouent un rôle important dans la capture d'antigènes et l'induction de la réponse immune. Le nombre et la localisation des dômes de Peyer varient entre les espèces. Leur nombre et leur taille augmentent avec l'âge, le poids corporel et la longueur du petit intestin (Kararli, 1995). Bien qu'il soit impossible d'affirmer avec certitude quel type cellulaire (cellules M ou entérocytes) favorise l'endocytose de particules par les dômes de Peyer, il n'en demeure pas moins que les cellules M jouent un rôle majeur. Le mécanisme de capture des particules par les cellules M n'est pas encore élucidé mais le mécanisme majeur d'entrée dans les cellules M serait une phagocytose (Norris et *al.*, 1998). La liaison sélective de particules aux cellules M peut être influencée par la nature de la surface de la particule. Ainsi, Jepson et *al.* ont montré que des particules de polystyrène de 0,5-0,6µm de diamètre se liaient préférentiellement et étaient phagocytosées par les cellules M lorsque comparées à des particules de poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) d'une taille similaire. A cause de son rôle dans la présentation de l'antigène, les cellules M sont des cibles pour l'administration de vaccins par voie orale.

#### **1.5.1.4 Tendances et applications**

Comme du point de vue du patient, la voie orale est plus facile et plus pratique d'utilisation, il en résulte un meilleur respect de la posologie principalement lors de traitement à long terme. De ce fait, malgré les obstacles reliés à l'administration orale de protéines, différentes recherches se poursuivent actuellement et proposent différentes pistes de solution pour augmenter l'absorption gastrointestinale des protéines et des peptides.



#### 1.5.1.4.1 Inhibiteurs enzymatiques

L'administration simultanée d'inhibiteurs enzymatiques a été l'une des premières stratégies pour contrer la protéolyse intestinale de protéines thérapeutiques. Plusieurs études ont démontré que la co-administration de l'insuline avec des inhibiteurs enzymatiques de la trypsine et de la chymotrypsine, augmentait la biodisponibilité de ce peptide (Kimura *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1994a). L'utilisation d'inhibiteurs naturels, comme l'aprotinine est préférée aux inhibiteurs synthétiques tels le diisopropyl fluorophosphate (DFP) et le tosyllysine chlorométhylcétone (TLCK) qui sont très toxiques. Cependant, la plupart des inhibiteurs naturels des protéases sont des polypeptides sensibles à l'action protéolytique des macromolécules qu'elles sont censées inhiber. L'emploi d'inhibiteurs enzymatiques ne représente donc pas une approche pratique pour protéger les biothérapeutiques de la protéolyse; car ils interfèrent avec la digestion de nutriments essentiels dont dérivent les acides aminés.

#### 1.5.1.4.2 Conjugués protéines-PEG

Une stratégie alternative à l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques est la conjugaison de PEG (poly(éthylène glycol) ou d'autres entités chimiques à la protéine d'intérêt. Les conjugués protéines-PEG administrés par voie orale montrent, suite à leur absorption dans la circulation sanguine, un temps de résidence accru et une immunogénicité moindre. La présence des chaînes de PEG crée une barrière stérique sur la surface de la protéine et restreint son accès aux opsonines (Delgado *et al.*, 1992). La compagnie Amgen a développé 2 conjugués de PEG: PEG-(G-CSF :granulocyte colony stimulating factor) et PEG-interféron dont les biodisponibilités sont accrues par comparaison aux formes natives suite à l'administration intraduodénale (Orellana-Gomez et Patton, 1998). Le désavantage majeur relié à cette stratégie est une perte partielle d'activité biologique de la protéine suite à la conjugaison.

#### 1.5.1.4.3 Promoteurs de l'absorption

Plusieurs substances (chélateurs de calcium, surfactants, sels biliaires, dérivés d'acides gras) ont été proposés pour augmenter la biodisponibilité orale de protéines thérapeutiques (Muranishi, 1990). Ces composés facilitent l'absorption en augmentant la perméabilité épithéliale principalement en perturbant la membrane des entérocytes (Anderberg et *al.*, 1992) mais aussi en induisant l'ouverture des jonctions serrées (tight junctions) (Hochman et Arthursson, 1994). De plus, certains promoteurs d'absorption peuvent inhiber les enzymes protéolytiques et réduire la viscosité de la couche de mucus. Les chélateurs de calcium et les sels biliaires perturbent l'homéostasie gastro-intestinale et engendrent des effets indésirables comme une irritation locale ou un dommage irréversible de la muqueuse intestinale. D'autres promoteurs moins toxiques comme le chitosan ouvrent la voie à de nouvelles possibilités. Le chitosan est un polysaccharide à base d'unités de glucosamine et de N-acétylglucosamine; c'est un polymère naturel biocompatible et biodégradable et est utilisé comme excipient dans plusieurs formulations thérapeutiques (Thanou et *al.*, 2001). Ce biopolymère et ses dérivés ont en plus de leur propriété de promoteur de l'absorption, de très bonnes propriétés mucoadhésives. Ces deux caractéristiques en font des composés de choix pour l'administration orale de peptides et de protéines.

#### 1.5.1.4.4 Modification des jonctions serrées

Pour éviter de perturber l'homéostasie de la muqueuse intestinale certains groupes de recherche ont développé des agents pour améliorer le transport paracellulaire des protéines. La toxine *Zonula occludens* (Zot) produite par *Vibrio cholerae* peut induire une dilatation des espaces intercellulaires au niveau des jonctions serrées de manière transitoire et réversible et faciliter ainsi l'absorption de diverses protéines allant de l'insuline (6.5kDa) à l'IgG (150kDa). Zot possède l'avantage d'être non cytotoxique et de n'agir qu'au niveau du petit intestin, éliminant ainsi les risques d'absorption non-spécifique de toxines bactériennes dans le gros intestin (Fasano, 1998).

#### 1.5.1.4.5 Micro-nanoparticules et vaccins

La voie orale est de loin la voie la plus attrayante pour l'administration de vaccins. Elle est facile d'utilisation, ne nécessite pas un personnel qualifié, améliore l'efficacité du vaccin en stimulant les muqueuses qui sont les sites d'entrée primaires des pathogènes (Van der Lubben et *al.*, 2001). Le système immunitaire de la muqueuse intestinale est constitué de tissus lymphoïdes dispersés et de tissus lymphoïdes organisés (dômes de Peyer). La réponse immunitaire à un antigène débute par sa capture par les cellules M des dômes de Peyer et à son transfert à des cellules présentatrices de l'antigène comme les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B. La phase suivante passe par l'activation des cellules  $CD4^+$  qui produisent les cytokines interleukine-4 (IL-4) et interleukine-5 (IL-5) qui permettent la différenciation des cellules B  $IgA^+$  en cellules B sécrétrices d'IgA (Mc Ghee et *al.*, 1992; Lebman et Coffman, 1988).

Comme les vaccins sont le plus souvent de nature polypeptidique et polysaccharidique, ils sont incorporés dans des particules synthétiques ou lipidiques pour éviter leur dégradation avant leur absorption intestinale. L'association de l'antigène à une particule polymérique de moins de 10 microns, offre cette protection et ralentit le transit gastrique de l'antigène ce qui facilite sa capture par les dômes de Peyer. Des microparticules de diamètre de près de 300µm peuvent être utilisées pour protéger l'antigène jusqu'à sa libération au niveau des dômes de Peyer. Par exemple, l'immunisation orale avec de l'IgG bovine conjuguée à des microparticules de polyacrylamide (1-3µm) (Cox et Taubman, 1984) ou avec de l'ovalbumine encapsulée dans des particules similaires (O'Hagan et *al.*, 1989) améliore le titre sérique de l'IgA comparativement à celui obtenu avec l'antigène soluble. La réponse immunitaire dépend de la nature, de la taille et de la dose des particules. Un des polymères les plus utilisés pour la préparation de vaccins encapsulés est le poly(lactide-co-glycolide) (PLG) qui est biodégradable et biocompatible (Tableau IV).

Deux autres types de particules de nature lipidique soient les complexes immuno-stimulateurs (ISCOM : ImmunoStimulatory Complexes) et les cochléates servent aussi à l'encapsulation d'antigènes pour l'administration orale de vaccins. Les ISCOM<sup>TM</sup> sont des cages tridimensionnelles de 30 à 70nm de diamètre, obtenues par le mélange de saponine (Quil A), un puissant immunoadjuvant, avec des lipides et du cholestérol. Vu leur nature

lipidique, ces structures incorporent les antigènes de nature hydrophobe (Chen et Langer, 1998). A l'heure actuelle, les études sur l'utilisation des ISCOM pour l'administration orale d'antigènes ont été restreintes aux souris. L'efficacité des ISCOM est similaire à celle observée avec les particules de PLG. Ainsi l'administration orale d'ovalbumine, incorporée dans des ISCOMs induit une plus forte réponse des lymphocytes cytotoxiques T (CTL) que l'ovalbumine associée à des microparticules de PLG (Maloy et *al.*, 1994).

**Tableau IV :** Applications de la matrice d'acide poly(lactique-co-glycolide) pour l'immunisation orale

Polymère	Taille de la particule	Antigène	Espèce	Référence
PLG	2µm	<i>Fimbriae</i>	Souris	Jones (1996)
PLG	3-6µm	Ricin	Souris	Kende (1995)
PLG	1-10µm	Influenza	Souris	Moldoveanu (1993)
PLG	1-10µm	SIV	Primate	Marx (1993)

Adapté de O'Hagan D.T. (1998) *Adv. Drug Deliv. Rev.* **34**, 305-320.

Les cochléates qui sont des précipités de phospholipides et de calcium formant une large bicouche lipidique enroulée en spirale, peuvent contenir les protéines membranaires bactériennes et les glycoprotéines de surface de l'enveloppe de virus. Les cochléates diffèrent des liposomes car ils ne possèdent pas d'espace interne aqueux. De plus, les ions calcium aident au maintien de la structure spiralée (Chen et Langer, 1998). La capacité des

cochléates à générer une réponse humorale ou cellulaire, en fait des candidats d'avenir pour la vaccination orale. A titre d'exemple, l'administration orale de cochléates associées à un plasmide encodant les protéines virales *env*, *rev* et *tat* du virus VIH (Virus de l'immunodéficience humaine) induit une forte réponse cellulaire cytolytique contre les cellules infectées (Gould-Fogerite et *al.*, 2000).

### **1.5.2 Voie intraveineuse**

La voie intraveineuse représente le mode d'administration intravasculaire des médicaments le plus fréquemment employée comparativement à la voie intra-artérielle. Elle consiste à administrer dans une veine, un volume d'une solution médicamenteuse. L'administration d'un principe actif par cette voie, permet une action rapide du médicament et un meilleur contrôle du dosage car on évite la phase d'absorption reliée à l'administration orale.

#### **1.5.2.1 Physiologie vasculaire**

Le lumen des vaisseaux sanguins, en particulier les capillaires où s'effectuent la plupart des échanges de solutés, est délimité par une couche de cellules endothéliales. Sous les cellules endothéliales, une couche de matériel fibrillaire dense est retrouvée et sert de support. Cette couche est appelée lamina basal. Le lamina basal est formé principalement de collagène de type IV et de protéines adhésives de hautes masses moléculaires comme la laminine et la fibronectine (Madri et *al.*, 1980). Chez l'humain, la surface totale du système capillaire systémique est estimée à 60m<sup>2</sup>. Trois principaux types de capillaires ont été décrits : 1) l'endothélium sinusoïdal ou discontinu trouvé dans le foie et la rate; 2) l'endothélium à fenestrations des glandes endocrines et des glomérules rénaux et 3) l'endothélium continu qui est trouvé dans la plupart des tissus tels les muscles, les organes comme le poumon et le tractus gastro-intestinal et le système nerveux central. L'endothélium des capillaires sinusoïdaux présente des pores dont les dimensions peuvent aller au millier d'angstroms en diamètre alors que l'endothélium fenestré se caractérise par une très fine couche cellulaire (0.05-0.1µm) traversée d'ouvertures circulaires de 600-800 angstroms (Poznansky et Juliano, 1984). D'un point de vue morphologique, le système

vasculaire endothélial ressemble à un épithélium simple, excepté qu'on y observe une perméabilité accrue à l'eau, aux petites molécules hydrosolubles et à certaines macromolécules allant de l'albumine (68kDa) aux lipoprotéines plasmatiques (2000kDa) (Smith et Staples, 1982).

#### **1.5.2.2 Barrières physiologiques**

Le profil de la concentration plasmatique d'un biothérapeutique revêt une importance primordiale lorsqu'on veut atteindre une concentration thérapeutique à un organe ou un tissu cible. En général, les peptides et les protéines thérapeutiques administrés par voie intraveineuse, possèdent un court temps de résidence dans la circulation sanguine. Les biothérapeutiques de faible poids moléculaire (< 40kDa) sont éliminés par filtration rénale avec un temps de demi-vie de 5 à 10 minutes (comme l'insuline (6.5kDa) ou la superoxyde dismutase (30kDa) (Maeda et *al.*, 1992). Ils peuvent être aussi inactivés par le système immunitaire ou par les endo- et les exopeptidases présentes dans le sang (Veronese et Morpurgo, 1999).

#### **1.5.2.3 Barrière physiologique aux principes actifs particuliers : SRE.**

Les divers systèmes particuliers utilisés pour la libération contrôlée de biothérapeutiques sont rapidement éliminés de la circulation sanguine suivant l'injection intraveineuse (Gref et *al.*, 1995). Ce phénomène est observé quelque soit la nature chimique des particules : albumine (Saphiro et *al.*, 1990), acide polylactique (Allémann et *al.*, 1994), polycyanoacrylate (Kreuter et *al.*, 1979), acide poly(lactique-co-glycolide) (Li et *al.*, 2001). Ces particules, lors de leur passage dans le sang, sont reconnues comme du non-soi et elles sont phagocytées par les macrophages situés dans le système réticulo-endothélial (SRE). L'activité phagocytaire se retrouve dans la rate et principalement dans le foie. En effet, plus de 85% de la phagocytose intravasculaire liée au SRE est attribuable aux cellules de Kupffer (macrophages du foie) (Saba, 1970). La phagocytose rapide de liposomes est favorisée par l'opsonisation ou l'adsorption des protéines C3 et C4 du système du complément sur la surface de ces particules (Scieszka et *al.*, 1991) ou d'IgG (Hsu et Juliano, 1982). La phagocytose se déroule en 2 étapes. Elle débute par l'opsonisation et puis, par l'interaction

entre les opsonines et leurs récepteurs sur la membrane des macrophages, ce qui les conduit à leur internalisation. Les macrophages possèdent en surface des récepteurs pour le domaine F<sub>c</sub> des IgG (Ogmundsdotti et Weir, 1980) et pour deux protéines du système du complément (Lambriss et Ross, 1982) ainsi qu'un site de liaison pour la fibronectine (Hsu et Juliano, 1982).

Les vecteurs macromoléculaires comme les conjugués protéine-anticorps (Ac) où l'Ac est de type IgG, peuvent se lier directement aux récepteurs des domaines F<sub>c</sub> des macrophages. Certains types de vecteurs polymériques, particulièrement les espèces chargées négativement, pourraient activer la voie alterne du système du complément (Allison, 1978) ainsi les groupes hydroxyles des polysaccharides sont des cibles pour la protéine C3 du complément alors que les groupes amines de la polylysine activent la protéine C4 (Torchilin et Papisov, 1994). En résumé l'action du SRE cause une clairance et une séquestration rapide d'une variété de vecteurs macromoléculaires ou particuliers.

#### **1.5.2.4 Tendances et applications**

Les biothérapeutiques administrés par la voie intraveineuse ont une efficacité limitée à cause de leurs caractéristiques inhérentes : courte demi-vie plasmatique, inactivation possible à 37°C, sensibilité à la protéolyse et nature immunogénique. Pour pallier à ces désavantages et exploiter le potentiel thérapeutique de ces macromolécules, deux principales stratégies ont été élaborées.

##### **1.5.2.3.1 Vecteurs solubles : bioconjugaison**

Les travaux de Ringdorf ont établi les bases de la bioconjugaison et cette technique s'est imposée comme un élément important en sciences pharmaceutiques (Ringdorf, 1975). Un bioconjugué, le produit de la bioconjugaison, se définit comme un complexe macromoléculaire synthétique obtenu par liaison covalente d'un principe actif à un polymère. Elle permet de stabiliser la présence du principe actif dans la circulation (Monfardini et Veronese, 1998), de protéger les produits labiles de la dégradation enzymatique (Zalipsky, 1995; Delgado et *al.*, 1992), de réduire l'immunogénicité des polypeptides (Sehon, 1991) et dans certains cas d'exploiter de nouvelles voies pour la pénétration cellulaire (Takakura et

*al.*, 1998). La bioconjugaison permet aussi le ciblage de tissus ou organes par l'addition d'Ac monoclonaux ou de résidus polysaccharidiques spécifiques aux récepteurs de certains types cellulaires. Plusieurs types de polymères ont été évalués pour créer des bioconjugués à base de protéines, les plus utilisés étant le dextran et le monométhoxypoly(éthylène glycol) (mPEG).

Parmi les conjugués protéine-dextran ayant connu un certain succès, on peut citer la streptokinase-dextran (Streptodekase®) utilisée en clinique depuis 1980 pour le traitement des pathologies cardio-vasculaires et ophtalmologiques résultant de thromboses. La Streptodekase® est administrée en une dose unique au lieu d'une infusion en continu, sa toxicité est plus faible et son temps de résidence dans le corps humain passe de quelques minutes pour l'enzyme native à 1-3 jours pour le conjugué (Torchilin et *al.*, 1982). La plasmine, une autre protéine impliquée dans la voie de la coagulation, a été conjuguée avec le dextran et présente des caractéristiques pharmacocinétiques et immunologiques similaires à celles de la streptokinase conjuguée (Chazov et *al.*, 1984). Sur un conjugué aprotinine-dextran, un inhibiteur de protéases à sérine utilisé pour le traitement de pathologies protéases-dépendantes, la présence de résidus galactoses, en plus de l'augmentation du temps de résidence dans la circulation et une diminution de l'immunogénicité, cible le conjugué vers les hépatocytes qui possèdent des récepteurs pour ce sucre (Larionova et *al.*, 1985).

En plus des avantages reliés à son unique groupe fonctionnel qui empêche la réticulation du conjugué, le m-PEG est non-toxique, non-immunogénique et son utilisation est approuvée chez l'humain par le FDA (Pang, 1993; Sehon, 1991). En raison de ces caractéristiques, la liste des protéines conjuguées avec du m-PEG est longue (Fortier, 1994). Deux bioconjugués se détachent du lot soit la m-PEG-adénosine déaminase (ADA) et la m-PEG-asparaginase. Le conjugué m-PEG-ADA (Adagen®) est utilisé en thérapie de remplacement chez les patients atteints d'une déficience de l'enzyme ADA, une maladie héréditaire qui cause une immunodéficiences et des infections à répétition chez la personne atteinte. L'administration du conjugué m-PEG-ADA a montré une efficacité thérapeutique plus longue et une immunogénicité moindre comparée à l'enzyme soluble. Elle représente une alternative de choix à la thérapie génique pour le traitement de cette maladie (Fairbanks et *al.*, 1994). L'utilisation en clinique de la m-PEG-asparaginase (Oncospar®) a été approuvée par le FDA comme agent anti-tumoral spécifique pour le traitement de la leucémie



lymphoblastique aiguë. Oncospar® ne génère pas de réaction immune comme celle observée avec les injections à répétition de l'asparaginase soluble isolée de *E. coli* (Abuchowski et *al.*, 1984). Plusieurs autres conjugués comme le PEG-hémoglobine et le PEG-interféron (Rebetol®) utilisés dans le traitement de diverses tumeurs sont en cours de développement (Veronese et Morpurgo, 1999).

Malgré les risques de réticulation inhérents à leur emploi, plusieurs polymères synthétiques polyfonctionnels sont sous évaluation pour la bioconjugaison de protéines. En utilisant les conditions optimales de synthèse, des biocojugués ayant des propriétés biologiques très prometteuses ont été obtenus. Ainsi, le copolymère de styrène et d'anhydride maléique a été conjugué au polypeptide neocarcinostatine (SMANC), le plus puissant polypeptide anti-tumoral. Maeda et son équipe, suite à une étude exhaustive, ont démontré que SMANC induisait chez 70 à 90% des personnes traitées, une rémission de leur cancer (Maeda, 1997).

#### 1.5.2.3.2 Vecteurs particuliers

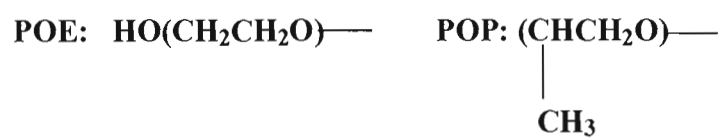
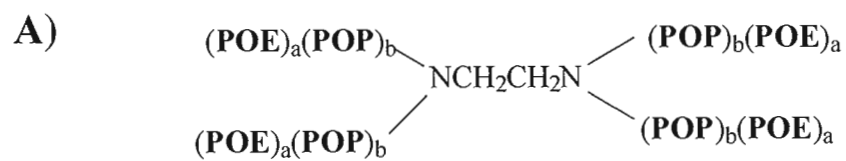
L'immobilisation physique des biothérapeutiques dans des particules leur offre une protection contre l'inactivation biologique cependant, l'action du SRE nullifie cet avantage en éliminant rapidement de la circulation sanguine ces particules. Les caractéristiques physicochimiques interfaciales des vecteurs particuliers ont été étudiées afin de contrer l'action du SRE (Wilkins et Myers, 1966). Au point de vue de la taille des particules, celles-ci doivent avoir un diamètre inférieur à 5 microns pour circuler dans les capillaires. Cependant, pour échapper à la filtration par la rate, le diamètre de ces particules devrait être de moins de 200nm (Moghimi et *al.*, 1991). Lorsque les particules ont une surface de charge neutre et hydrophile, le temps de circulation dans le sang est prolongé car ces caractéristiques permettent d'échapper à la phagocytose (Allen, 1994; Müller et Kissel, 1993). La modification de surface des particules peut se faire de deux manières. Elle peut être obtenue par l'addition covalente d'une chaîne de polymère à la surface de la particule ou bien encore, par adsorption de la partie hydrophobe du polymère sur la surface de la particule par des interactions hydrophobiques. Dans les deux cas, les fragments hydrophiliques des polymères sont exposés à la solution et protègent les particules des interactions avec les protéines du sang : on dit alors que la particule est stabilisée stériquement (Torchilin, 1998).

#### 1.5.2.3.2.1 Stabilisation stérique

Pour stabiliser stériquement des particules, les polymères liés ou adsorbés doivent demeurer flexibles, c'est à dire que le polymère conserve sa rotation libre en solution ce qui empêche les protéines du sang d'interagir avec la surface de la particule. Plus le polymère est flexible, plus le nombre de conformations possibles et la vitesse de transition d'une conformation à l'autre augmentent. Ainsi, un polymère hydrosoluble et très flexible va exister statistiquement comme une distribution de conformations possibles couvrant l'ensemble de la surface de la particule (Torchilin et Papoïsov, 1994). Lorsqu'un polymère rigide est utilisé, il en résulte peu de mouvement de la chaîne de polymère en surface de la particule, donc une faible densité du nuage de conformations possibles ce qui permet la diffusion et la liaison des protéines plasmatiques sur la surface de la particule. Par exemple, le dextran qui est un polymère hydrosoluble mais rigide, offre peu de protection contre l'adsorption des protéines plasmatiques comparativement au m-PEG qui est hydrophile mais très flexible (Torchilin et *al.*, 1994b; Blume et Cevc 1993)

#### 1.5.2.3.2.2 Adsorption en surface : Cas des surfactants

En 1983, Illum et son équipe ont été les premiers à utiliser les poloxamères et les poloxamines (Figure 6), des copolymères contenant des unités de PEO et de POP (oxyde de poly(propylène)) pour la modification des caractéristiques de surface de particules. Ils ont démontré avec des nanoparticules de polystyrène que la présence de PEO orienté vers la surface, diminuait l'opsonisation et la phagocytose par les cellules de Kupffer (Illum et *al.*, 1987a; 1984; 1983). D'autres groupes ont obtenu des résultats similaires par l'adsorption du Poloxamère-338 sur des nanoparticules de polystyrène (Tan et *al.*, 1993; Waltrous-Peltier et *al.*, 1992; O'Mullane et *al.*, 1990) ou de poly(méthyl méthacrylate) (Tröster et *al.*, 1990). L'adsorption du copolymère se fait en solution en présence de particules dont la surface est hydrophobique (polystyrène, poly(lactide-co-glycolide), poly(méthylméthacrylate), poly(phosphazène) et poly(butyl 2-cyanoacrylate)). Il s'y produit des interactions hydrophobes entre la surface et les domaines hydrophobiques poly(propylène oxyde) (POP).



**Figure 6 :** Structure chimique de poloxamines (**A**) de poloxamères (**B**) et de poly(éthylène glycol) (**C**).

Les chaînes de PEO constituant les domaines hydrophiliques du copolymère, interagissent avec l'environnement aqueux et stabilisent les particules et empêchent leur agglomération par un effet de répulsion (Storm, 1995). En analysant les complexes formés entre les poloxamères adsorbés sur des nanoparticules de styrène de tailles différentes, Li et *al.* ont démontré l'importance de la courbure de la surface de la particule sur la mobilité de la chaîne hydrophile et sur sa conformation (Li et *al.*, 1994). De plus, la taille et la proportion des segments du POP et du PEO dans la structure du copolymère influencent la force de liaison hydrophobe à la surface des particules. La densité du polymère qui sera adsorbé à la surface dépendra aussi de la grosseur de son domaine hydrophobique. Ainsi, les polymères les plus efficaces dans la suppression de la reconnaissance de nanoparticules hydrophobiques (15-200nm) par le SRE sont ceux contenant au moins 40 unités centrales d'oxyde de propylène et 70 unités latérales d'oxyde d'éthylène soit le Poloxamère-908, le Poloxamine-1508 et le Poloxamère-407 (Tableau V). A l'instar du PEG, les chaînes de PEO étant très hydratées et mobiles créent une barrière stérique qui empêche l'opsonisation et l'interaction avec les cellules phagocytiques (Moghimi et Hunter, 2000). Il est à noter que les forces en jeu dans les interactions hydrophobes ne sont pas toujours suffisantes pour éviter une désorption du surfactant à la surface de particules. Effectivement *in vivo*, certaines protéines du sang possédant une forte affinité pour la surface hydrophobe des particules, peuvent induire la désorption du surfactant et conduire à une rapide élimination de la circulation de ces particules (Petrak, 1993). Pour contrer ce phénomène, la liaison chimique covalente du copolymère, par exemple le PEG, à la surface de la particule a été envisagé.

#### 1.5.2.3.2.3 Addition covalente : cas du PEG

Le PEG est un des polymères les plus populaires que l'on greffe à la surface de particules pour prolonger leur temps de résidence dans la circulation sanguine. Le PEG utilisé à cette fin possède un poids moléculaire compris entre 1900 et 5000 Da. Pour les liposomes, le PEG est préalablement lié covalamment aux phospholipides pour permettre l'ancrage du PEG dans la membrane lipidique lors de la synthèse. La protection conférée par le PEG lié aux liposomes dépendra de sa longueur de la chaîne d'ancrage hydrophobique (phospholipides), du poids moléculaire de PEG et de sa densité à la surface du liposome (Torchilin, 1998). A titre d'exemple, le temps de demi-vie dans la circulation sanguine pour

**Tableau V:** Exemples de poloxamères et de poloxamines et de leurs applications

Polymère	Poids moléculaire	Unités EO	Unités PO	Applications
<b>Poloxamères</b>				
188	8400	2 x 52	30	Antithrombique
401	2000	2 x 5	67	Synthèse de nanoparticules lymphotropiques
402	2500	2 x 11	67	Synthèse de nanoparticules lymphotropiques
407	12600	2 x 98	67	Synthèse de particules avec temps de circulation élevé Gel à libération lente
<b>Poloxamines</b>				
904	6700	4 x 15	4 x 17	Synthèse de nanoparticules lymphotropiques
908	25000	4 x 119	4 x 17	Synthèse de particules avec temps de circulation élevé

EO : éthylène d'oxyde; PO : oxyde de propylène. Tiré de S. Moghimi and C. Hunter (2000) *TIBTECH*

les liposomes de diamètre se situant entre 155-180nm, augmente de 15 à 230 minutes lorsque leur surface est modifiée par un pourcentage molaire de PEG de 7%. De plus, leur accumulation dans le SRE est diminuée (Torchilin et Trubetskoy 1995; Klibanov et *al.*, 1990). Le temps de demi-vie sanguine supérieure des liposomes stabilisés stériquement par le PEG a permis la commercialisation de 2 médicaments soit le Doxil® et le Daunoxome® qui contiennent respectivement de la doxorubicine et de la daunorubicine et qui sont principalement utilisés pour le traitement du cancer (Lasic, 1998).

Le PEG peut être aussi greffé covalement à la surface de micro- ou de nanoparticules par réaction chimique. Ces expériences ont surtout utilisé des nanoparticules qui, par leur faible taille, peuvent échapper à la filtration exercée par le foie et la rate. Ainsi l'addition covalente de PEG 2kDa à la surface de particules de polystyrène (PS) de 1µm (Harper et *al.*, 1991) ou de particules de 220-280nm de poly(éthylcyanoacrylate) (PECA) (Fontana et *al.*, 2001) stabilise ces particules stériquement et retarde *in vitro* leur phagocytose en présence de macrophages. Cependant, le greffage du PEG peut affecter l'activité biologique du principe actif contenu dans la particule. En 1994, Gref et *al.* ont proposé à la place, d'utiliser un copolymère d'acide poly(lactide-co glycolide) dont le groupe pendant est du poly(éthylène glycol). Cette approche incorpore directement le PEG lors de la synthèse de la particule. Ces particules à base de copolymères PEG/PLGA montrent une biodistribution altérée et un temps de résidence plus long dans la circulation sanguine. Une étude comparative chez la souris utilisant des particules de 140nm fait de PLGA ou de PLGA modifié avec du PEG de 20kDa a montré que 66% et 30%, respectivement, de ces particules se retrouvaient au foie et que seulement 5% et 30%, respectivement, de ces particules demeuraient en circulation 5 minutes après l'injection intraveineuse (Gref et *al.*, 1995, 1994). Si les particules utilisées sont de 113nm, le temps de demi-vie augmente à 7 h pour les particules de PLGA-PEG (Panagi et *al.*, 2001). Le même phénomène est observé avec des particules faites avec d'autres types de polymères ayant comme groupe pendant du PEG. Effectivement, on obtient des temps de demi-vie sanguine de l'ordre de 7.4h pour des particules de 150nm faites de m-PEG - cyanoacrylate-co-n-hexadecyl cyanoacrylate (M-PEG-PHDCA) (Li et *al.*, 2001a). D'autre part, plus le temps de demi-vie est élevé dans la circulation, plus une nanoparticule a de chance de s'accumuler dans les tumeurs qui possèdent une vascularisation plus perméable

que les organes sains comme les études de Li et *al.* l'ont démontré avec le facteur de nécrose tumoral (TNF-  $\alpha$ ) (Li et *al.*, 2001b).

### **1.5.3 Administration par la voie nasale**

La voie nasale a été utilisée pour l'administration systémique de principes actifs depuis les temps anciens. Bien que sa surface d'absorption de 50cm<sup>2</sup> soit inférieure à celle du poumon, la muqueuse nasale offre un site efficace pour l'absorption rapide de principes actifs hydrosolubles ou liposolubles de faible masse moléculaire. Le nez est bien vascularisé et les molécules administrées par cette voie se retrouvent directement dans la circulation et évitent ainsi le premier passage hépatique (Davis, 1999).

#### **1.5.3.1 Anatomie et physiologie nasale**

Le nez est une structure proéminente, situé entre les deux yeux et ses ouvertures externes sont les narines. A l'intérieur, il donne accès au nasopharynx et conduit à la trachée et à l'oesophage. Il représente le site d'entrée primaire de l'air dans le système respiratoire et joue un rôle de filtration et d'humidification de l'air inspiré. La cavité nasale est composée d'épithéliums squameux, respiratoire et olfactif. Plus de 60% de la surface épithéliale de la muqueuse naso-pharyngale est recouverte d'un épithélium squameux stratifié. Cet épithélium est composé de cellules basales qui ont un rôle structural et sont les progéniteurs des autres types cellulaires. Pour l'absorption nasale, l'épithélium respiratoire joue le rôle le plus important et il est tapissé par les cellules en colonne ciliées et non-ciliées, les cellules gobelets et les cellules basales. Les cellules en colonne et les cellules gobelets se situent du côté apical de la couche cellulaire adjacente au lumen de la cavité nasale. Les cils des cellules en colonne transportent le mucus sécrété par les cellules goblet vers l'oesophage par un mouvement ciliaire. Les cellules basales sont adjacentes au lamina basal du côté basolatéral de l'épithélium. Sous le lamina basal se trouve le lamina propria qui est riche en capillaires sanguins. Les routes d'absorption proposées pour la voie nasale seraient de type transcellulaire, paracellulaire ou transcytotique (Marttin et al., 1997; Monteiro-Rivière et Popp, 1984).

A la surface épithéliale du nez, peu de cellules immunitaires sont présentes, alors que dans la sous-muqueuse, de nombreux mastocytes, lymphocytes T et B et cellules de Langerhans présentatrices de l'antigène sont retrouvés. La muqueuse nasale possède donc un excellent potentiel pour l'immunisation (Mygind et Dahl, 1998). En dépit de sa facilité d'utilisation, la voie nasale présente un certain nombre d'obstacles qui peuvent bloquer l'absorption de médicaments et que l'on doit prendre en compte lors de la conception d'un système à libération contrôlée pour un médicament.

### **1.5.3.2 Mucus et clairance mucociliaire**

Le mucus qui tapisse l'épithélium de la cavité nasale, est de nature visqueuse et permet de piéger les particules inhalées. Ce mucus est composé d'eau (95%), de mucines (2%) et d'autres protéines incluant des immunoglobulines, de l'albumine (1%), des sels inorganiques (1%) et des lipides (<1%) (Kaliner et al., 1984). Les glandes des sous-muqueuses et à un degré moindre, les cellules goblet synthétisent les mucines (glycoprotéines) qui confèrent au mucus sa viscosité. Ainsi, sous l'action du battement des cils des cellules ciliées en colonne, le mucus et les particules qui s'y trouvent sont évacués vers l'oesophage. Ce mécanisme efficace s'appelle la clairance mucociliaire et sa vitesse se situe entre 3 à 25 mm/min, conférant au mucus une demi-vie moyenne de 15 minutes (Soane et al., 1999; Proctor, 1982). La clairance mucociliaire constitue le premier obstacle à l'obtention d'une bonne biodisponibilité d'un principe actif (Harris et al., 1986).

### **1.5.3.3 Poids moléculaire du médicament**

Une compilation des études portant sur l'absorption nasale de médicaments réalisée par Mc Martin et al. a montré que la vitesse d'absorption d'un médicament est inversement proportionnelle à son poids moléculaire (Mc Martin et al., 1987). Ils ont de plus suggéré l'existence de canaux hydrophiliques de différentes porosités pour expliquer le taux d'absorption de substances aux masses moléculaires variées. Il a été démontré que les molécules de masse moléculaire inférieure à 1000Da sont absorbées par un mécanisme complexe qui tient compte du coefficient de partition de la substance (Donovan et Huang, 1998). Par l'utilisation de molécules modèles comme les di-iodo-L-tyrosine-dextran de



différents poids moléculaires; des biodisponibilités de 52.7% et de 0.6% ont été déterminées, respectivement, pour les dextrans de 1260 et de 14500Da de masses moléculaires (Fisher et *al.*, 1991). Une autre étude a montré que des composés de 1.5 et 50kDa avaient des biodisponibilités respectives de 5 et 0.5% et ce, indépendamment de leurs propriétés physicochimiques (Donovan et Huang, 1998). A titre indicatif, une liste partielle des médicaments administrés par voie nasale est donnée au Tableau VI.

De plus, soulignons que l'épithélium nasal possède une barrière enzymatique contre l'entrée de xénobiotiques. Plusieurs enzymes sont présentes dans la cavité nasale telles les cytochromes oxydases P-450, la lactate deshydrogénase, la phosphatase acide, des exo- et endopeptidases, des oxydoréductases, des hydrolases, des estérases etc... (Behl et *al.*, 1998; Hussain, 1998).

#### **1.5.3.4 Tendances et applications**

Diverses stratégies ont été mises de l'avant pour expérimenter les possibilités offertes par la voie nasale pour l'administration de peptides et de protéines thérapeutiques.

##### **1.5.3.4.1 Promoteurs de l'absorption nasale**

La recherche sur l'absorption nasale a connu un essor rapide suite aux pressions des compagnies pharmaceutiques et d'études qui montraient que les patients n'aimaient pas recevoir des injections et que la voie per os n'était pas un succès pour l'administration de macromolécules biologiques. Cet essor de la recherche a conduit à la mise au point de produits promoteurs de l'absorption nasale. Ainsi, il a été démontré que les sels biliaires tel le déoxycholate de sodium, le glycocholate de sodium et le taurocholate de sodium permettent de diminuer la viscosité du mucus et de créer des pores hydrophiliques transitoires dans la bicouche membranaire cellulaire (Hirai et *al.*, 1981). De même, l'acide tétraacétique diamine éthyle (EDTA) et les sels d'acides gras augmentent le transport paracellulaire en captant le calcium luminal permettant d'accroître la perméabilité des jonctions serrées. Les détergents non-ioniques comme le Laureth-9 quant à eux, vont altérer la structure et la perméabilité membranaire (Davis, 1999). L'action de ces promoteurs est généralement non-spécifique et peut engendrer des dommages à la muqueuse nasale (Hosoya et *al.*, 1994; Hersey et Jackson,

**Tableau VI :** Produits pharmaceutiques obtenus sur ordonnance et administrés par voie nasale

Produit commercial	Principe actif	Systémique/Local	Pathologies traitées
Beconase®	Beclomethasone	Local	Allergies
Rhinocort®	Budenoside	Local	Allergies
Stadol N.S.®	Butorphanol	Local	Migraine
Miacalcin®	Calcitonine	Systémique	Ostéoporose
Stimate®	Desmopressine	Systémique	Hémophilie
Synarel®	Nafareline	Systémique	Endométriose
Syntocinon®	Oxytocine	Systémique	Induction de la lactation

Adapté de Behl C.R. (1998) *Adv. Drug Deliv. Rev.* **29**, 89-116.

1987). D'autres molécules moins irritantes comme les cyclodextrines et les méthyl- $\beta$ -cyclodextrines ont été proposées comme promoteurs de l'absorption et les études réalisées chez l'humain ont démontré une absence de toxicité (Merkus et *al.*, 1999; 1996; Matsubara et *al.*, 1995). Le chitosan, un polysaccharide cationique de haute masse moléculaire, a également été utilisé comme promoteur de l'absorption. Le chitosan est non-toxique et bien toléré chez l'humain (Illum et *al.*, 1998) et il possède également des propriétés mucoadhésives dues aux interactions ioniques entre ses groupes amines et les résidus d'acide sialique retrouvés sur les glycoprotéines du mucus (Lehr et *al.*, 1992). Le chitosan permet d'augmenter l'absorption des peptides comme l'insuline, l'hormone parathyroïde et la calcitonine (Illum et *al.*, 2000; 1994). Des études, effectuées avec des cellules en culture ont montré qu'en plus de ses propriétés mucoadhésives, le chitosan favorisait l'absorption en ouvrant les jonctions serrées entre les cellules (Dodane et *al.*, 1999).

Deux stratégies ont été proposées pour accroître le temps de résidence nasale des médicaments et ainsi favoriser leur absorption soient : les promoteurs de la viscosité et une formulation bioadhésive pour réduire la vitesse de clairance mucillaire.

Nagai et *al.* dans un effort pour augmenter l'absorption nasale de l'insuline ont mélangé ce peptide avec un dérivé de cellulose. Le mélange forme un gel en s'humidifiant lorsqu'administré dans la cavité nasale et prolonge ainsi le temps de résidence de l'insuline (Nagai et *al.*, 1984). Des observations similaires ont été constatées avec la desmopressine contenant 0.25% de méthylcellulose (Harris et *al.*, 1988) ou bien avec de l'hydroxypropylméthylcellulose (Pennington et *al.*, 1988).

Un hydrogel à température critique fait de (poly(oxyéthylène-b-oxypropylène-b-oxyéthylène)-acide poly(acrylique) qui est liquide à température de la pièce, se solidifie à la température corporelle. En utilisant cet hydrogel, Jackson et *al.* ont montré que près de 10% de l'hydrogel était retenu dans la cavité nasale, 20 heures après son administration par vaporisation (Jackson et *al.*, 1997).

#### **1.5.3.4.2 Polymères et microsphères**

Parmi les formulations bioadhésives utilisées, on retrouve les microsphères administrées par voie nasale qui sont insolubles dans l'eau mais qui possèdent la capacité

de gonfler et former un gel en absorbant de l'eau. Elles sont le plus souvent à base d'albumine, d'amidon ou de dextran. A titre d'exemple, 50% des microsphères à base d'albumine et d'amidon ou bien encore 60% des microsphères à base de dextran étaient encore présentes dans la cavité nasale et ce 3 heures après leur administration. Ainsi, plus le temps de contact microsphères-muqueuse nasale sera long et plus l'absorption nasale de principes actifs pourra se faire (Pereswetoff-Morath, 1998).

Les microsphères bioadhésives ont été introduites en 1987 par Illum et *al.*. Sans utiliser de promoteurs de l'absorption, ces auteurs ont obtenu une meilleure biodisponibilité de la calcitonine et de l'insuline (Illum et *al.*, 1990; 1988; 1987b; Farraj et *al.*, 1990). Compte tenu des tailles des microsphères adhésives utilisées (6 et 45µm), le transport paracellulaire de ces particules est exclu. Ainsi l'augmentation observée pour l'absorption nasale des peptides contenus dans ces microsphères mucoadhésives serait due à deux phénomènes. Premièrement, la bioadhésion permet de diminuer la clairance mucillaire de la particule et donc du peptide, favorisant ainsi une meilleure absorption de ce dernier (Illum et Davis, 1992). Deuxièmement, l'ouverture transitoire des jonctions serrées entre cellules serait induite par la présence des microsphères ce qui faciliterait ainsi le passage des macromolécules hydrophiliques (Edman et *al.*, 1992). L'ouverture des jonctions serrées résulte de la déshydratation du mucus qui survient lors de l'hydratation *in situ* des microsphères. Cette ouverture des jonctions serrées explique la rapide normalisation du glucose sanguin qui est observée lorsque l'insuline est administrée avec des particules sèches d'amidon dégradables (Björk et Edman, 1990; 1988). Ces microsphères sont *in vivo* peu toxiques et très peu immunogéniques (Pereswetoff-Morath et Edman, 1996; Björk et *al.*, 1991).

#### **1.5.3.4.3 Vaccination par voie nasale**

La muqueuse nasale est une composante importante du système immunitaire mucosal car elle est le point d'entrée pour les particules inhalées. L'immunisation par voie nasale s'est donc imposée comme étant la voie la plus efficace pour l'immunité mucosale et périphérique (Davis, 2001). Parmi les avantages reliés à la vaccination par voie nasale, on peut citer (Partidos, 2001) :

- 1) facilité d'accès

- 2) riche vascularisation pour l'absorption systémique
- 3) présence de microvillosités qui augmente la surface d'absorption
- 4) induction d'une réponse immune et systémique
- 5) vaccination rapide de larges groupes
- 6) ne nécessite pas l'emploi de seringues et d'aiguilles qui sont sources d'infections potentielles et d'inconfort.

Ainsi chez l'homme, la cible d'un vaccin administré par voie nasale est le NALT (Nasal Associated Lymphoid Tissue) qui est situé principalement dans le pharynx. L'épithélium du NALT comprend notamment des cellules épithéliales ciliées, des cellules goblet et des cellules spécialisées non-ciliées similaires aux cellules M des dômes de Peyer. Le NALT est sous la surface épithéliale et contient des agrégats de follicules lymphoïdes (cellules B) et des aires inter-folliculaires (cellules T), des macrophages et des cellules dendritiques dans un réseau réticulé assez lâche (Sminia et Kraal, 1999).

Lorsque l'antigène est administré, il est traité et présenté au tissu lymphoïde, ce qui active les cellules T qui aideront les cellules B à se spécialiser en des cellules circulantes productrices d'IgA (Partidos, 2001; Wu et *al.*, 1997, Wu et Russell et 1997). L'interaction entre l'antigène et la muqueuse nasale et le NALT dépend de la nature physique de l'antigène (soluble ou particulaire), de la dose et de la fréquence de contact (Sminia et Kraal, 1999). L'antigène est ensuite drainé vers les ganglions lymphatiques cervicales postérieures où il peut induire une réponse mucoale locale ou distale ou conduire à la tolérance (Davis, 2001).

Les cellules M présentes en surface du NALT sont très efficaces pour la capture d'antigènes particuliers et pour leur présentation aux cellules présentatrices des tissus lymphoïdes sous-jacents (Giannasca et *al.*, 1997; Neutra et *al.*, 1996). Cette caractéristique des cellules M peut être exploitée pour la conception de vecteurs bioadhésifs qui peuvent agir comme adjuvant afin d'augmenter la réponse immunitaire contre l'antigène.

Actuellement, le PLGA est le polymère le plus utilisé pour la fabrication de vaccins microencapsulés car il empêche la dégradation précoce de l'antigène et permet son ciblage vers les tissus lymphoïdes des muqueuses (Vajdy and O'Hagan, 2001). Par

exemple, l'administration d'antigènes *Bordetella pertussis* encapsulés dans des microparticules de PLGA induit chez la souris une immunité contre le pathogène (Cahill et al., 1995; Shahin et al., 1995). Dans une étude comparative des propriétés adjuvantes de différentes formulations de l'antigène gD2 du virus herpes simplex, Ugozzoli et al., ont montré que les toxines encapsulées dans des microparticules de PLGA avaient les plus hauts titres d'IgA dans les sécrétions mucosales et un titre intéressant d'IgG sérique (Ugozzoli et al., 1998). Ces données démontrent que la vaccination par voie nasale par des antigènes encapsulés dans des microparticules est une stratégie efficace pour l'induction d'une réponse humorale spécifique dans les sécrétions mucosales ainsi qu'une bonne réponse humorale systémique et même cellulaire. Des souris vaccinées avec des microparticules de PLGA contenant un dérivé lipidique du peptide gp120 du virus du SIDA, ont montré une réponse humorale et une activation de cellules T cytotoxiques (Mora et al., 1998). D'autres types de microparticules ont été utilisées a fin de vaccination nasale tels que des microparticules de diamètre de 1 à 100µm de TS-PDMS [3-(triéthoxysilyl)propyl-terminé polydiméthylsiloxane] (Heritage et al., 1998) ou bien des microparticules d'amidon recouvert avec un polymère de silicone (Mc Dermott et al., 1998).

Quatre conditions sont donc requises pour qu'une vaccination nasale soit efficace. D'abord le vaccin doit être résistant aux conditions extrêmes de l'environnement mucosal et servir de guide à l'antigène à travers le mucus jusqu'aux sites d'induction où se trouvent les cellules présentatrices. Ensuite, la réponse immune générée doit pouvoir s'étendre aux sites mucosaux distants et provoquer une réponse systémique puissante. Finalement, les cytokines générées doivent promouvoir une réponse cellulaire incluant une composante lymphocytaire T cytotoxique. Ainsi, d'autres approches ont été développées à cet effet. Les complexes immunostimulateurs (ISCOM) répondent à ces critères (Hu et al., 2001). Ils ont été décrits pour la première fois en 1984 (Morein et al., 1984) et ils sont faits d'une structure en cage de 40nm ayant une géométrie icosaédrique et qui sont assemblés à partir de sous-unités de 10-12nm composées de saponine et de cholestérol (Özel et al., 1989). L'assemblage de la structure de l'ISCOM et l'incorporation de l'antigène sont facilités par l'addition de phospholipides et médiés principalement par des interactions hydrophobiques.

Le SMBV<sup>TM</sup> (SupraMolecular BioVector) est un nouveau vecteur développé pour l'administration nasale d'antigènes et il imite la structure d'une particule virale avec une couche interne d'hydrogel polysaccharidique entourée par une bicouche lipidique. Comme les virus, ils sont très petits (60nm) et ils peuvent intégrer dans leur couche lipidique des protéines membranaires alors que la couche interne peut recevoir des protéines. Cette similarité structurale avec les virus génère une forte activation du système immunitaire contre les antigènes présentés sans aucune réaction spécifique avec la particule de SMBV<sup>TM</sup>. Les SMBV<sup>TM</sup> cationiques possèdent de plus, des propriétés mucoadhésives (von Hoegen, 2001).

#### **1.5.4 Voie intrapulmonaire**

A cause de leur faible biodisponibilité orale, la majorité des protéines et peptides thérapeutiques sont administrés par injection intraveineuse. Cependant les poumons semblent une route d'administration systémique pleine de promesses entre autres pour les peptides et les protéines car ils possèdent des caractéristiques différentes de la voie nasale tel que nous en discuterons dans les prochaines pages.

##### **1.5.4.1 Anatomie et physiologie pulmonaire**

Les voies respiratoires chez l'humain sont divisées en voies aériennes supérieures et inférieures. Les voies aériennes supérieures comprennent le nez, le pharynx, le larynx, la trachée et les bronches. Les bronchioles terminales et les alvéoles constituent les voies aériennes inférieures. Les voies aériennes supérieures sont formées d'un épais épithélium pseudostratifié (30-40µm), imperméable et similaire aux épithéliums du nez et du tractus gastro-intestinal. On retrouve dans cet épithélium cinq types cellulaires : la cellule épithéliale ciliée, la cellule basale, la cellule goblet, la cellule de Kultschitzky et la cellule de Clara. En surface de l'épithélium des voies aériennes supérieures, on retrouve une mince couche de mucus (5 µm). Ce dernier est formé essentiellement de mucopolysaccharides complexés avec de l'acide sialique. Le mucus est une solution aqueuse contenant de 2-3% de mucine et 1-2% d'électrolytes. La région alvéolaire est

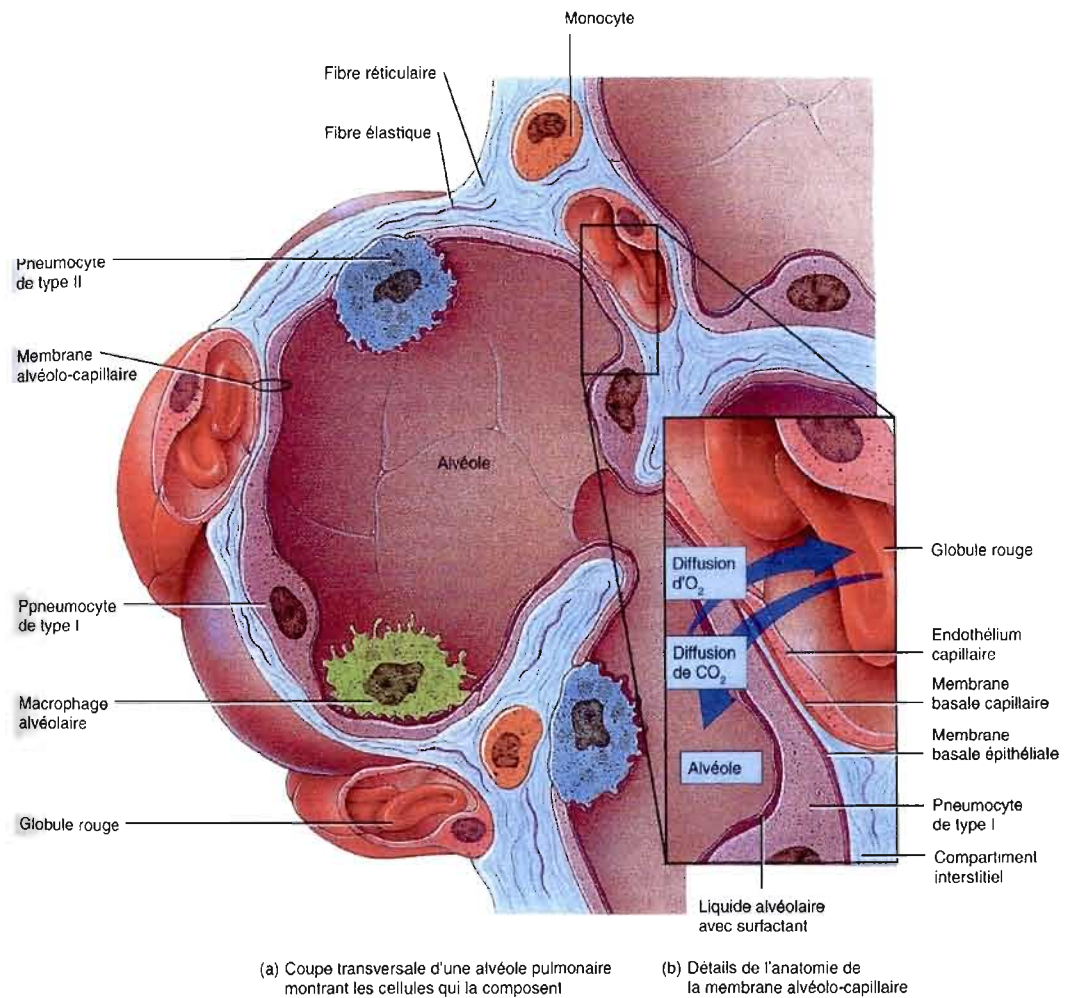
constituée par un épithélium très mince (0.1-0.2 $\mu$ m) permettant une surface d'absorption de plus de 100m<sup>2</sup> chez l'humain. Deux types principaux de cellules forment l'épithélium alvéolaire. Les cellules de type I sont des pneumocytes membranaires non-phagocytiques et représentent 95% de la surface alvéolaire (Figure 6). Les cellules de type II sont plus grosses et de forme cuboïdale. Elles ont une activité métabolique élevée et sécrètent le liquide alvéolaire constitué d'un mélange complexe de phospholipides et de protéines agissant comme surfactant. La fonction principale du surfactant consiste à réduire la tension de surface des alvéoles et à participer à la clairance de particules inhalées. D'autres types cellulaires sont retrouvés dans les alvéoles comme les macrophages qui sont des hôtes permanents et des lymphocytes en quantité moindre. La région alvéolaire est le siège des échanges gazeux entre le sang et l'air, échanges qui sont facilités par 1) la faible épaisseur, 2) la grande surface d'absorption des cellules de type I, 3) la présence d'un riche lit capillaire en dessous des alvéoles et 4) une mince membrane interstitielle entre les capillaires et les cellules de type I qui oppose peu de résistance au passage de macromolécules (Washington *et al.*, 2001; Niven, 1995; Schanker, 1978).

Le poumon de par ses caractéristiques décrites précédemment représente un candidat intéressant pour l'administration systémique de protéines et peptides thérapeutiques. Cependant, dû à son emplacement à l'interface corps-environnement extérieur, le poumon est doté de différents mécanismes de défense contre tout matériel inhalé pour empêcher leur passage dans la circulation sanguine systémique.

#### **1.5.4.2 Inhalation**

Habituellement l'administration de médicaments par la voie pulmonaire s'effectue sous forme de fines gouttelettes ou d'aérosol. A cause de la structure ramifiée du poumon, plus on progresse vers les alvéoles, plus le pouvoir de pénétration de l'aérosol est réduit. Il en ressort que les caractéristiques de surface, de taille, de charge et de densité des particules de l'aérosol détermineront le lieu de leur dépôt au niveau des alvéoles. C'est au niveau des alvéoles seulement que se produira l'absorption et le passage dans la circulation sanguine du médicament. A partir d'études menées tant du point de vue théorique (Clark et Egan, 1994; Heyder et Rudolf, 1984) qu'expérimental (Adjei et Garren, 1990; Heyder *et al.*, 1975;





**Figure 7 :** Structure et fonction d'une alvéole pulmonaire. Tiré de Tortora G.J. et Grabowski S.R. (2000) *Principes d'Anatomie et de Physiologie*.

Davies et al., 1972) il a été mis en évidence que la déposition est maximale dans la région alvéolaire pour des particules dont le diamètre aérodynamique moyen se situait entre 1 et 3 $\mu$ m. L'inhalation de principes actifs aérosolisés anti-asthmatiques tient compte de ce diamètre optimal comme en font foi la terbutaline (1.8 $\mu$ m), le salbutamol (3.3 $\mu$ m) et l'isoproterenol (1.5 $\mu$ m) (Clay et al., 1986; Johnson et al., 1989; Rufin et al., 1986).

Suite à la déposition du médicament dans les alvéoles, le mucus est la première barrière rencontrée. Le mécanisme de régulation de la production de mucus n'a pas été complètement élucidé. Elle serait contrôlée localement par un réseau neural et par la stimulation chimique reliée à la présence de matériel exogène. L'épaisseur de la couche de mucus varie tout au long des voies respiratoires, atteignant une valeur moyenne de 5-10 $\mu$ m dans les voies aériennes supérieures et diminuant de manière graduelle en direction des alvéoles. La viscosité du mucus permet la capture des particules inhalées (aérosol, particule colloïdale ou autre matériel exogène). Selon sa composition, la particule sera dissoute dans le mucus pour atteindre les alvéoles sous-jacentes ou sera évacuée par la bouche via la trachée par le battement ciliaire des cellules épithéliales (Niven, 1995).

Au niveau des zones profondes des voies aériennes (alvéoles), il n'y a pas de mucus. Ce dernier est remplacé par le surfactant qui contient une forte proportion de phospholipides et plusieurs apoprotéines. Le fluide alvéolaire ou surfactant est constitué d'une monocouche insoluble de phospholipides qui s'oppose à tout contact direct entre le matériel inhalé insoluble et les cellules alvéolaires. Le surfactant induit aussi l'aggrégation de ce matériel pour en faciliter la phagocytose par les macrophages alvéolaires (Patton, 1996).

Les cellules de type I forment la majorité des cellules épithéliales alvéolaires. Bien que relativement minces, leur étroit agencement avec les cellules de type II crée une barrière continue qui s'oppose au passage des alvéoles vers les capillaires de principes actifs inhalés. Cependant, il a été démontré que des peptides et des protéines de poids moléculaires variés (insuline 5.8kDa, l'hormone de croissance 22kDa) (Smith, 1997; Patton et Platz, 1992) pouvaient franchir cette barrière pour se retrouver dans la circulation sanguine. Trois mécanismes ont été proposés pour expliquer la translocation des macromolécules du côté apical au côté basal de l'épithélium alvéolaire.

#### **1.5.4.2.1 Le transport paracellulaire via les jonctions serrées (tight junctions)**

Ce mécanisme de transport est restreint aux polypeptides dont le poids moléculaire est inférieur à 40 kDa. Les jonctions serrées sont des structures protéiques importantes qui maintiennent la perméabilité sélective de l'épithélium alvéolaire. Elles représentent le point de jonction des cellules épithéliales adjacentes et les entourent sur une partie de leur circonférence près de la surface apicale créant ainsi une polarisation des surfaces apicale et basale. Les pompes ioniques et d'autres protéines sont distribuées asymétriquement entre les surfaces apicale et basolatérale (Schneeberger and Lynch, 1992). La perméabilité des jonctions serrées est dynamique et elle est régulée autant par les protéines du cytosquelette que par la concentration intracellulaire de calcium. Les jonctions serrées épithéliales causeraient une plus grande résistance à la diffusion de solutés hydrosolubles que les jonctions serrées des capillaires endothéliaux. L'étude du flux de l'albumine entre les espaces interstitiels vasculaire et pulmonaire chez le mouton montre que 92% de la résistance au flux d'albumine réside dans l'épithélium (Gorin et Stewart, 1979). Ces résultats sont en accord avec le fait que les jonctions serrées épithéliales ont un rayon estimé entre 0.5 et 0.9nm contre 6.5 et 7.5nm pour les jonctions serrées endothéliales (Taylor et Gaar, 1970). Ces études *in vivo* montrent que l'épithélium alvéolaire est la plus importante barrière au transport de protéines.

#### **1.5.4.2.2 Le transport par les pores membranaires**

Ce mécanisme est rendu possible lors de la nécrose ou de l'apoptose de cellules ce qui crée un espace dans l'endothélium ou l'épithélium ou par la présence de pore à la jonction de trois cellules. Les pores générés par un défaut de l'épithélium alvéolaire sont rares, transitoires et dépendent de la vitesse de remplacement des cellules mortes (28-35 jours dans les voies alvéolaires) (Bowden, 1983). Ces pores seraient responsables de l'absorption de macromolécules de taille supérieure à 5-6nm ou de masse moléculaire supérieure à 40kDa.

Dans l'épithélium alvéolaire au point de jonction de trois cellules, on observe une discontinuité sans jonction, c'est à dire la présence d'une pore dont la largeur moyenne peut atteindre 27nm. Cependant, le diamètre effectif de ce complexe tricellulaire de jonction peut

être diminué par la présence de glycocalyx cellulaire provenant des trois cellules et qui agit comme un filtre. Le glycocalyx est une vaste couche polysaccharidique retrouvée en surface des cellules et formée par la partie glucidique des glycoprotéines de membrane. On a calculé que le poumon humain pouvait contenir plus de 350 trilliards de ces complexes. Peu d'études systématiques ont été réalisées jusqu'à ce jour sur le mécanisme d'absorption pulmonaire par les pores et il est difficile d'évaluer sa contribution réelle à l'absorption de macromolécules (Patton, 1996).

#### **1.5.4.2.3 Le transport vésiculaire ou transcytose**

Cette voie d'absorption peut être médiée ou non par un récepteur et a été proposée suite à la découverte de la présence de vésicules endocytiques dans les cellules épithéliales de type I. Ces vésicules ont un diamètre d'environ 70nm avec une ouverture de 40nm qui peut être restreinte par la présence de glycolax. Suivant ce mécanisme, les macromolécules inhalées pénètrent dans une de ces vésicules situées en surface des cellules (Williams, 1984). Par la suite, la vésicule se détache du côté apical et migre vers la surface basale de la cellule et son contenu est relâché dans l'interstitium à travers laquelle la lymphe coule. Si la macromolécule a un poids moléculaire supérieur à 40kDa, elle se retrouvera dans la lymphe (Supersaxo et *al.*, 1990), alors que si cette molécule a un poids moléculaire inférieur à 40kDa, elle entrera dans la circulation sanguine par transcytose via les cellules endothéliales capillaires (Patton et Platz, 1992).

#### **1.5.4.2.4 Endothélium vasculaire**

Les macromolécules inhalées dans les zones alvéolaires doivent franchir une dernière barrière avant de se retrouver dans le sang. Cette barrière est constituée par une monocouche cellulaire qui forme les parois des microvaisseaux, l'endothélium. A l'instar de l'épithélium alvéolaire, l'épithélium endothélial présente des jonctions serrées aux pores plus larges et des complexes tricellulaires de jonction contribuant à sa perméabilité aux macromolécules. L'immense surface d'absorption du poumon repose sur un lit capillaire de dimensions équivalentes. Les macromolécules inhalées qui ont pu se rendre à l'interstitium par transcytose épithéliale se retrouveront dans la circulation sanguine par deux voies.

La première voie est directe et implique la transcytose endothéliale des macromolécules de poids moléculaire inférieure à 40kDa. La vitesse de transcytose de ces macromolécules est inversement proportionnelle à leur poids moléculaire (Schanker et *al.*, 1983). Certaines exceptions ont été notées, ainsi l'acétate de leuprolide (1.2kDa) utilisé en aérosol pour le traitement de l'endométriose atteint une concentration plasmatique maximale, 90 minutes après son administration (Adjei et Garren, 1990) contre 30 minutes pour l'insuline de poids moléculaire plus élevé (5.7kDa) (Wigley et *al.*, 1971).

La seconde voie est indirecte et implique la capture de la macromolécule de poids moléculaire supérieure à 40kDa par le système lymphatique qui traverse l'interstitium. La taille de ces macromolécules faisant obstacle à leur passage direct dans la circulation sanguine, elles peuvent diffuser dans la lymphe en traversant les parois discontinues et minces du système lymphatique. Après filtration du matériel exogène dans les ganglions, la lymphe reviendra dans la circulation sanguine ainsi que les macromolécules s'y trouvant (Patton, 1996).

#### **1.5.4.2.5 Macrophages et enzymes.**

Le macrophage est considéré comme une barrière efficace à l'absorption pulmonaire de macromolécules. Cette cellule est mobile et réside dans les régions alvéolaires. Leur nombre peut augmenter rapidement au cours d'une réaction inflammatoire (Brain, 1992). Il a la capacité d'ingérer rapidement les particules inhalées. A titre d'exemple, la majeure partie d'une instillation colloïdale de Tc (technétium)-99m de soufre est phagocytée par les macrophages alvéolaires en moins d'une heure (Beck et *al.*, 1982). De même, suite à l'administration pulmonaire de particules de polystyrène de 6µm, les deux tiers des particules avaient été phagocytées par les macrophages après seulement quelques minutes (Gehr et *al.*, 1993). L'action phagocytaire s'applique aussi aux solutés. Effectivement, Williams a démontré que la capture par les macrophages de molécules traceuses telle la ferritine et le dextran de poids moléculaire 70kDa était possible à des degrés variables (Williams, 1984). Durant l'inflammation, le macrophage est capable de synthétiser toute une batterie de composés tels que les peroxydes, les interleukines, les leucotriènes et les protéases qui créeront un environnement hostile pour la macromolécule inhalée (Takemura et Werb, 1984).

Les biothérapeutiques polypeptidiques sont exposés à une barrière métabolique à leur arrivée dans la région alvéolaire. Les exo- et endopeptidases sont des protéases ubiquitaires du poumon. Elles sont présentes dans les sécrétions extracellulaires ou se retrouvent liées à la membrane de la majorité des cellules endothéliales et épithéliales. Le rôle des peptidases est un rôle de protection et de contrôle (Bloom et Polak, 1985). La lysozyme, une enzyme antibactérienne, y est toujours présente. Pour éviter l'autodestruction du tissu pulmonaire, des antiprotéases, comme l'anti-trypsine et l'anti-élastase, veillent (Hubbard et Crystal, 1986). Le potentiel de destruction de cette voie a été exagéré comme le montre une instillation d'albumine marquée à l'iode-125 dans les poumons de moutons suivant laquelle la protéine marquée a été retrouvée intacte dans le plasma, l'urine et les fèces (Berthiaume et al., 1989). Des comportements similaires ont été observés suivant l'instillation pulmonaire d'albumine bovine sérique ou d'un analogue de la vasopressine de poids moléculaires respectifs de 67 et 1 kDa chez le rat ou le porc (Folkesson et *al.*, 1993; 1992; 1990).

#### **1.5.4.3 Tendances et applications**

La voie pulmonaire possède une large surface d'absorption au niveau des alvéoles, une distance minimale entre la voie air/sang et elle permet d'éviter le premier passage hépatique (O'Hagan et Illum, 1990). De par ces caractéristiques, la voie pulmonaire peut devenir une nouvelle voie non-invasive d'administration des biothérapeutiques (peptides et protéines) et devrait être bien acceptée par les patients.

Les principaux systèmes servant à livrer les médicaments aux poumons fonctionnent par nébulisation lorsque le médicament est sous forme de solution ou d'émulsion, ou par un inhalateur à doses prémesurées (MDI) lorsque le médicament est sous forme d'une fine poudre. Dans chaque cas, le principe actif est mélangé avec des ingrédients inertes ou excipients qui le protègent de la dégradation chimique et qui améliorent sa conservation (Johnson, 1997). L'action du médicament peut être locale ou bien systémique suite à son passage dans la circulation sanguine (Tableau VII).

##### **1.5.4.3.1 Administration de protéines thérapeutiques par voie pulmonaire**

C'est en 1958 que la DNase d'origine bovine, sous forme de solution, a été approuvée pour le traitement de la fibrose kystique (Shak et *al.*, 1990). Cette préparation permettait de

diminuer la viscosité des sécrétions pulmonaires. Cependant, son utilisation clinique a dû être abandonnée car la présence de protéases dans les préparations enzymatiques causait des effets secondaires non négligeables. Plus récemment, la désoxyribonucléase recombinante humaine (rhDNase), une glycoprotéine de masse moléculaire de 29kDa, a été approuvée par le FDA pour le traitement de la fibrose kystique chez l'humain. Sous le nom de Pulmozyme, cette enzyme est la première protéine recombinante qui a été développée spécifiquement pour l'administration pulmonaire. Les études cliniques sur la rhDNase ont montré une absence de toxicité, cependant son efficacité thérapeutique bien que statistiquement significative, demeure encore marginale (Ranasinha, 1993).

L'alpha-1 antitrypsine-1 (A1A) est un inhibiteur de l'élastase dans les voies aériennes inférieures. Une carence en A1A induit un emphysème progressif fatal compte tenu que l'équilibre protéases/antiprotéases est rompu (van Steenbergen, 1993). L'anti-protéase naturelle, de masse moléculaire de 52kDa est actuellement extraite du plasma humain et est utilisée en thérapie sous le nom de Prolastin. Une protéine recombinante a été produite chez *E.coli* et elle a une masse moléculaire de 45kDa. Cette protéine recombinante est rapidement absorbée dans la circulation sanguine et elle atteint une concentration plasmatique maximale après 3 à 4 heures suivant son administration par aérosol dans les poumons. Après une semaine de traitement, une normalisation des niveaux de A1A est observée chez les sujets traités (Hubbard et *al.*, 1989).

L'interféron gamma ( $\gamma$ -IFN) est une cytokine de masse moléculaire variant entre 20-25 kDa et est synthétisée par les lymphocytes T activés. Cette protéine active différentes cellules effectrices dont les macrophages alvéolaires. Cette propriété immunomodulatrice du  $\gamma$ -IFN a été utilisée pour stimuler *in vivo* les macrophages (Eisenberg et *al.*, 1991). Ainsi, il a été démontré que le  $\gamma$ -IFN pouvait augmenter le taux de survie de souris infectées avec *P. carinii* sans induire de toxicité (Beck et *al.*, 1991). Cette lymphokine pourrait également avoir des applications pour le traitement de la maladie du légionnaire (Skerrett et Martin, 1994).

L'insuline, qui est une petite protéine de masse moléculaire de 6kDa, est la macromolécule modèle très souvent utilisée dans les études d'administration pulmonaire de protéines car son effet hypoglycémiant requiert son passage dans la circulation sanguine. Le diabète de type I qui est caractérisé par une sécrétion insuffisante d'insuline touche jusqu'à 40 personnes par 100,000 habitants (Karvonen et *al.*, 1993).

**Tableau VII : Biothérapeutiques administrés par voie pulmonaire**

Biothérapeutique	Masse moléculaire (kDa)	Action du médicament	Pathologie traitée
Oxytocine	1	Systémique	Remplacement d'hormone
Leuprolide	1.2	Systémique	Endométriose
Glucagon	3.5	Systémique	Remplacement d'hormone
Calcitonine	4.5	Systémique	Ostéoporose
Insuline	6	Systémique	Diabète
Interleukine-2	15.4	Local	Cancer métastatique du poumon
Interféron	19.6	Local/Systémique	Hépatite C
Somatotrophine	22.1	Systémique	Nanisme
DNase	33	Local	Fibrose cystique
Antitrypsine	42	Local	Fibrose cystique
Catalase	240	Local	Toxicité à l'oxygène
Gène CFTR	---	Local	Thérapie génique/fibrose cystique

Tiré de Niven R.W. (1995) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems* **12**, 151-173.



Elle est administrée par injection sous-cutanée plusieurs fois par jour ce qui explique l'intérêt pour un mode d'administration moins invasif comme l'inhalation pulmonaire. La première tentative d'administration pulmonaire de l'insuline a été faite par Gansslen en 1925. Son expérience sera reprise en 1971 par Wigley (Niven, 1995). Un tel décalage s'explique par la difficulté de mettre au point des systèmes (nébulisateurs, MDI) capables de livrer par inhalation des doses fiables et reproductibles d'insuline sachant qu'une surdose d'insuline peut entraîner une hypoglycémie fatale chez l'utilisateur. Yoshida et *al.*, en utilisant un MDI adéquat, ont montré que la biodisponibilité de l'insuline par voie pulmonaire se rapprochait de celle observée suite à une administration par voie sous-cutanée (Yoshida et *al.*, 1979). Malgré ces résultats, ce n'est que tout récemment que des études précliniques ont confirmé que la pharmacocinétique de l'insuline après administration pulmonaire par aérosol était appropriée chez les animaux (Choi, 2001) et chez l'homme (Laube, 2001; 1993).

La calcitonine, une petite protéine de masse moléculaire de 4.5kDa, a été utilisée avec succès par voie nasale pour le traitement de l'ostéoporose, de l'hypercalcémie et de la maladie de Paget (Tolino et *al.*, 1993). Chose surprenante, peu d'études sur l'administration pulmonaire de ce peptide ont été réalisées. Patton et *al.*, après instillation intratrachéale chez le rat des calcitonines humaine ou de saumon, ont observé une rapide absorption du peptide qui atteint une concentration plasmatique maximale après 30 minutes avec une biodisponibilité de 17% (Patton et *al.*, 1994).

Les granulocytes sont des éléments importants de la réponse de l'hôte à une infection dont la réponse est régie par le facteur de stimulation de colonies de granulocytes (G-CSF) (DeLamarter, 1988). La protéine recombinante humaine produite chez *E. coli* est un polypeptide de masse moléculaire de 18.8kDa et est administrée chez le patient par injection intraveineuse. Pour les patients souffrant de granulocytopenie chronique, ces derniers préféreraient une méthode d'administration moins invasive. Des études sur l'administration nasale ou pulmonaire par aérosol de la rhG-CSF chez le rat ont montré que la protéine est absorbée dans la circulation sanguine en moins de 10 minutes, cependant elle y est éliminée rapidement. De plus, la biodisponibilité de la rhG-CSF est plus élevée par voie pulmonaire (Machida et *al.*, 1996). Pour pallier au temps de demi-vie plasmatique très court, la protéine recombinante a été conjuguée avec le PEG et ce, avec succès (Niven et *al.*, 1994).

L'acétate de leuprolide est un nonapeptide de masse moléculaire de 1.2kDa et est utilisé en clinique comme un analogue de l'hormone libérant la gonadotropine pour traiter l'endométriose, le cancer de la prostate et pour supprimer la synthèse de testostérone (Adjei et Hsu, 1993; Miller, 1990). Une biodisponibilité de 28% est observée chez l'humain lorsqu'administrée par voie pulmonaire comparativement à une biodisponibilité de 1 à 2% par voie nasale (Adjei et *al.*, 1992).

#### **1.5.4.3.2 Vecteurs de transport de biothérapeutiques pour l'inhalation pulmonaire.**

L'administration pulmonaire par aérosol d'un biothérapeutique de nature peptidique permet d'atteindre rapidement le niveau thérapeutique sanguin. Cependant, pour maintenir cette concentration et ainsi éviter la nécessité de plusieurs doses, les chercheurs se sont tournés vers l'utilisation de systèmes de libération contrôlée pouvant être utilisés par voie pulmonaire.

##### **1.5.4.3.2.1 Liposomes**

Très tôt, on a eu recours à l'utilisation de liposomes pour prolonger l'effet thérapeutique de principes actifs administrés par voie pulmonaire. L'une des premières études a montré que l'association d'arabinoside  $\beta$ -cytosine, un agent anti-cancéreux, à des liposomes permettait de confiner le médicament dans les poumons et d'obtenir un temps de demi-vie de 6 h contre seulement 20 min pour le médicament libre administré de la même façon (Mc Cullough et Juliano, 1979). Une étude plus exhaustive a permis de conclure que l'utilisation de liposomes augmentait l'efficacité de l'agent anti-cancéreux et en minimisait les effets secondaires (Juliano et Mc Cullough, 1980).

Dans plusieurs pathologies pulmonaires, la production d'espèces oxygénées réactives (ion superoxyde, peroxyde d'hydrogène) induit un stress oxydatif dans les cellules endothéliales. Pour y remédier, des enzymes comme la catalase et la superoxyde dismutase ont été incorporées dans des liposomes afin d'augmenter les défenses anti-oxydantes de l'endothélium. Chez des rats exposés à de fortes concentrations d'oxygène, un taux de survie supérieur à 72h a été constaté lorsque ces derniers étaient traités avec cette préparation liposomale (Padmanabhan et *al.*, 1985).

L'interleukine-2, sous forme libre, utilisée dans le traitement des métastases pulmonaires a des effets systémiques toxiques et indésirables. La formulation de cette cytokine dans des liposomes suivi de son administration sous forme d'aérosol dans les poumons chez le chien (Khanna et *al.*, 1997) ou chez l'homme (Skubitz et Anderson, 2000) a démontré une absence de toxicité systémique.

Liu et al. ont utilisé de l'insuline incorporée dans des liposomes et ils ont observé une rétention accrue de l'insuline dans les poumons chez le rat et un effet hypoglycémique plus marqué que l'insuline libre administrée de la même façon (Liu et *al.*, 1993).

Malgré leur stabilité structurale précaire, notamment lors de leur storage, les liposomes ont leur place comme micro-vecteurs de transport pour l'inhalation pulmonaire de principes actifs biologiques. Leurs caractéristiques de surface peuvent être améliorées tel que nous l'avons décrit précédemment et l'addition de lectines, permettrait d'augmenter leur bioadhérence et par conséquent, leur temps de résidence dans le poumon (Abu-Dahab et *al.*, 2001)

#### **1.5.4.3.2.2 Micro-, nanoparticules**

Peu d'études ont été réalisées sur l'utilisation de micro- ou de nanoparticules pour l'administration pulmonaire de biothérapeutiques dû en outre à la difficulté du dosage. De l'insuline a été incorporée dans des nanoparticules de PLGA ayant un diamètre de 400nm et ont été administrées par nébulisation chez le cochon d'Inde à une dose d'insuline de 3.9 IU/kg. Une diminution significative de la glycémie et même une hypoglycémie a été observée sur une période de 48 heures, comparativement à une période de 6 heures lorsqu'une solution d'insuline est employée (Kawashima et *al.*, 1999). Des résultats similaires ont été obtenus avec des nanoparticules de 256nm de diamètre, faites de polybutylcyanoacrylate (PBCA) et qui ont été administrées par instillation intratrachéale chez des rats. Dans ce cas, la glycémie a diminuée de 50% en moins de 4 heures suivant l'administration d'une dose de 5IU/kg d'insuline, comparativement à une baisse observée de 22% avec une dose identique d'insuline libre. De plus, l'effet hypoglycémiant durait plus longtemps avec l'insuline incorporée aux nanoparticules (Zhang et *al.*, 2001). Edwards et *al.*, ont développé des microparticules poreuses de 10µm de diamètre, avec une densité très faible de 0.09g/cm<sup>3</sup>. Ces particules sont aérodynamiquement comparables à des microparticules

non poreuses de  $3\mu\text{m}$ , ayant une densité de  $0.48\text{g/cm}^3$ . Ils ont démontré que les grosses particules poreuses de PLGA lorsque chargées d'insuline et administrées par aérosol dans les poumons de rats, vont libérer de l'insuline durant une période de près de 96 heures comparativement à une période de 8 heures observée avec des particules non-poreuses de  $3\mu\text{m}$  contenant une même dose d'insuline. La biodisponibilité relative de l'insuline libérée par les particules poreuses est 7 fois plus élevée que celle obtenue avec les particules non-poreuses (Edwards et *al.*, 1997). De plus, les particules poreuses de  $10\mu\text{m}$  se déposent dans les zones alvéolaires et ne sont pas phagocytées par les macrophages alvéolaires compte tenu de leur diamètre (Edwards et *al.*, 1998).

Morimoto et *al.* ont étudié l'effet de la taille et de la charge de surface de microparticules de gélatine sur l'absorption pulmonaire de la calcitonine. Ils ont observé que les petites particules chargées positivement, de diamètre se situant entre  $3.4$  et  $11.2\mu\text{m}$ , procuraient une meilleure biodisponibilité de la calcitonine soit 50% (Morimoto et *al.*, 2000). Des microparticules mucoadhésives d'hydroxypropylcellulose (HPC) dont le diamètre se situe entre  $1.3$  et  $2.6\mu\text{m}$  et incorporant de la fluorescéine ont été administrées par voie intratrachéale à des porcs. Une biodisponibilité de la fluorescéine de près de 88% a été calculée (Sakagami et *al.*, 2001).

#### **1.5.4.3.3 Emploi de promoteurs de l'absorption**

Pour améliorer la biodisponibilité de principes actifs administrés par la voie pulmonaire, les formulations utilisées incluent souvent des surfactants et/ou des inhibiteurs de protéases. Effectivement, une meilleure absorption de l'insuline a été observée lorsqu'elle est administrée conjointement avec divers adjuvants comme le glycocholate, la surfactine, le Span 85 ou le nafamostat (Okamura et *al.*, 1992). De plus, la coadministration de l'insuline avec certains promoteurs de l'absorption (glycocholate de sodium, N-lauryl- $\beta$ -D-maltopyranoside) et d'inhibiteurs de protéases (aprotinine, bacitracine) produit un effet hypoglycémique prolongé alors que l'administration d'insuline seule avait un effet hypoglycémique transitoire (Yamamoto et *al.*, 1994b). L'emploi des promoteurs d'absorption pulmonaire demeure cependant controversé, car il est démontré que certains promoteurs comme le Laureth-9 et le glycocholate de sodium induisent une inflammation pulmonaire aiguë (Suzuki et *al.*, 2000). Des agents moins toxiques ont été proposés pour l'absorption

intrapulmonaire de macromolécules comme les ions lanthanides ( $\text{Ln}^{3+}$ ) (Shen et *al.*, 2000), le glycodioxycholate de sodium (Wollmer et *al.*, 2000), les phospholipides (Mitra et *al.*, 2001), l'acide amino-propionique hydroxy méthyl (H-MAP) (Suarez et *al.*, 2001) ou bien encore les cyclodextrines (Shao et *al.*, 1994). Cependant, des études toxicologiques à long terme doivent être menées pour démontrer l'inocuité de ces agents.

## 1.6 Hydrogels

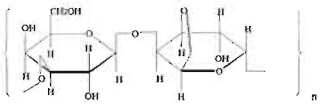
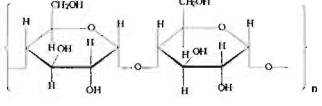
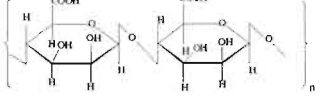
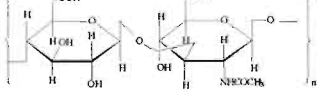
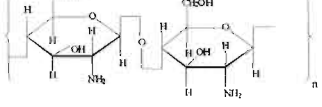
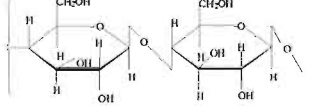
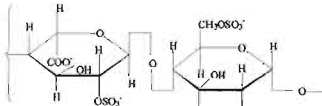
Depuis les premiers travaux de Wichterle et Lim en 1960 portant sur un hydrogel d'hydroxyéthyl de méthacrylate (HEMA), ces biomatériaux de type hydrogel hydrophile et biocompatible sont devenus des outils thérapeutiques (Wichterle et Lim, 1960). Ainsi, Lim et Sun ont utilisé des microcapsules d'hydrogel d'alginate pour l'encapsulation de cellules (Lim et Sun, 1980) tandis que Yannas et *al.* proposaient un hydrogel à base de collagène comme pansement artificiel pour les brûlures (Yannas et *al.*, 1989). L'intérêt pour les hydrogels ne se dément pas, vu le nombre croissant de publications consacrées à ce domaine. De 50 publications annuelles dans les années 1970, le nombre a augmenté à 700 en 2000. Un hydrogel se définit comme un réseau tridimensionnel à base de polymères hydrophiliques synthétiques ou naturels qui se gonfle en présence d'eau (Tableaux VIII, IX, X). Le réseau est formé par la réticulation des chaînes de polymère entre elles par liaison covalente, liaison hydrogène, interactions de Van der Waals ou physiques (Kamath et Park, 1993). Les hydrogels forment une matrice qui protège le principe actif de la dégradation et de l'inactivation, sa forte hydrophilicité permet l'incorporation de substances hydrosolubles et lui confère un caractère biocompatible. Certains hydrogels sont sensibles aux conditions environnementales et répondent à des stimuli aussi variés que la température, le pH et les champs électriques. Ces stimuli entraînent l'hydrogel dans une transition réversible de son volume de phase ou dans une transition réversible de phase sol-gel (Qiu et Park, 2001). De ce fait, on parlera d'hydrogels conventionnels et d'hydrogels dits intelligents qui sont sensibles aux conditions de leur environnement.

**Tableau VIII:** Monomères utilisés pour la synthèse d'hydrogels

Monomère	Ionicité	Hydrophobicité/Hydrophilicité	Structure
Méthacrylates d'hydroxyalkyl	Non-ionique	Hydrophile	$\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{ROH}$
Acrylamides N-substitués	Non-ionique	Hydrophile	$\text{H}_2\text{C}=\text{CHCONHR}$
Méthacrylamides N-substitués	Non-ionique	Hydrophile	$\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CONHR}$
Acétate de vinyle	Non-ionique	Hydrophobe	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{CH}=\text{CH}_2$
Acrylonitrile	Non-ionique	Hydrophobe	$\text{H}_2\text{C}=\text{CHCN}$
Styrène	Non-ionique	Hydrophobe	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{CH}_2$
Acide acrylique	Anionique	Hydrophile	$\text{H}_2\text{C}=\text{CHCO}_2\text{H}$
Acide méthacrylique	Anionique	Hydrophile	$\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{H}$
Acide crotonique	Anionique	Hydrophile	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCO}_2$
Méthacrylates d'aminoéthyl	Cationique	Hydrophile	$\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$

Tiré de Gehrke S.H. et Lee P.I. (1990) Dans *Specialized Drug Delivery Systems. Manufacturing and Production Technology*.

**Tableau IX:** Polymères naturels préformés utilisés pour la synthèse d'hydrogels.

Structure	Polymère	Charge
	Agarose	Non-ionique
	Amylose	Non-ionique
	Alginate	Anionique
	Acide hyaluronique	Anionique
	Chitosan	Cationique
	Cellulose	Non-ionique
	Héparine	Anionique
	Gélatine	Ampholyte
	Albumine	Ampholyte

Tiré de Gehrke S.H. (2000) Dans *Transport Processes in Pharmaceutical Systems*.

**Tableau X :** Polymères synthétiques préformés utilisés pour la synthèse d'hydrogels.

Polymère	Structure	Ionicité
Poly(éthylène glycol)	$\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$	Non-ionique
Poly(éthylène oxyde)	$-(\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{O-})_n$	Non-ionique
Poly(propylène oxyde)	$\text{H}(\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2)_n\text{OH}$	Non-ionique
Acide polylactique	$-(\text{OCHCH}_3\text{CO-})_n$	Non-ionique
Poly(cyanoacrylate)	$(\text{CH}_2\text{CNCOORC})_n^-$	Non-ionique
Poly(vinyl alcool)	$(\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH-}))_n^-$	Non-ionique
Poly(éthylène imine)	$\text{H}(\text{NHCH}_2\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$	Cationique
Polypeptides	$-(\text{NHCHRCO})_n^-$	Ampholytes

Tiré de Gehrke S.H. (2000) Dans *Transport Processes in Pharmaceutical Systems*.



### 1.6.1 Hydrogels conventionnels

Ces hydrogels utilisés sous forme d'implants macroscopiques ou microscopiques sont conçus pour libérer leur contenu localement et sans stimulus externe à un niveau prédéterminé d'où la nécessité d'utiliser des polymères biodégradables (gélatine, polypeptides) et biocompatibles (PEG, PEO) que l'hôte élimine sans difficultés (Zhao et Harris, 1998). Leurs applications sont variées, on les retrouve dans des produits courants aussi bien que dans des thérapies expérimentales de pointe. Le mimétisme de l'hydrogel avec les tissus biologiques, son caractère non-abrasif en font un implant idéal ce qui explique son utilisation comme lentille de contact (Nicholson et Vogt, 2001). L'hydrophilicité des hydrogels en fait un bon support pour la culture cellulaire et la régénération neuronale. Mosahebi et *al.* ont démontré une amélioration de la croissance de cellules de Schwann de 170% suite à leur suspension dans un hydrogel d'alginate (Mosahebi et *al.*, 2001). Ils ont aussi de bonnes propriétés de libération contrôlée. Effectivement, Schlegel et *al.* ont obtenu un taux de succès de 92% chez des patients atteints du cancer de la prostate qui avaient reçu un implant d'hydrogel contenant l'histrelina, un agoniste de l'hormone libérant la gonadotropine (Schlegel et *al.*, 2001).

Au début des années 1990, Fortier et *al.* ont inclus dans leur thématique de recherche la conception d'une matrice hydrophile qui permettait d'optimiser les performances d'enzymes modèles ou à intérêt thérapeutique. Cette orientation a favorisé le développement d'une matrice hautement hydrophile avec une teneur en eau supérieure à 96% et présentant de bonnes propriétés mécaniques (Gayet et *al.*, 1998). Cet hydrogel est formé par la réticulation chimique de PEG, un polymère biocompatible, et d'albumine de sources variées (boeuf, rat). Cet hydrogel s'est révélé une excellente matrice pour l'immobilisation d'enzymes comme la phosphatase acide (D'Urso et Fortier, 1996), l'asparaginase (Jean-Francois et Fortier, 1996), l'amine oxydase (Demers et *al.*, 2001) l'arginase et la glutaminase (Belgoudi et Fortier, 1999) et ce en prolongeant significativement leur demi-vie par rapport à l'enzyme soluble. La libération contrôlée de substances *in vitro* à partir de disques d'hydrogel de 0.1 à 0.3cm d'épaisseur s'effectue par un mécanisme de libération fickien pour des substances allant de la théophylline (180Da) au lysozyme (14.4kDa) (Gayet et Fortier, 1996). Des études *in vivo* chez des rats qui ont reçu des implants de 8mm de diamètre et 1.5mm d'épaisseur en sous-cutané,

montrent après 1 mois, l'apparition d'une mince capsule fibreuse autour de l'implant et une réaction inflammatoire tissulaire très faible (D'Urso et *al.*, 1995). La nature de l'hydrogel de PEG-albumine et les résultats obtenus *in vivo* démontrent une très bonne biocompatibilité de ce biomatériau. De plus, il a été démontré que les performances de l'asparaginase immobilisée dans l'hydrogel et implantée en cavité péritonéale chez le rat étaient améliorées. L'asparagine sérique était réduit à moins de 5% de sa valeur initiale pendant six jours. Après quatre mois d'implantation, 12% de l'activité enzymatique initiale était encore présente dans l'implant (Jean-Francois et *al.*, 1997). L'un des désavantages reliés à l'utilisation d'implants *in vivo* est la formation d'une capsule fibreuse et un faible rapport surface/volume qui limite les échanges entre l'implant et le milieu environnant, cependant l'utilisation de microparticules au lieu de disques pourrait pallier à ces inconvénients.

### 1.6.2 Hydrogels intelligents

Les systèmes de libération contrôlée ont des avantages considérables comparés aux formulations conventionnelles cependant ils montrent leurs limites lors du traitement de pathologies à caractère rythmique et chronique (diabète, troubles cardiaques). Les systèmes de libération contrôlée libèrent leur contenu d'une manière prédéterminée et ne sont pas en mesure de répondre aux fluctuations métaboliques. Par exemple, le niveau d'insuline doit augmenter qu'en réponse à l'hyperglycémie. Un système dit intelligent serait par contre capable de libérer son principe actif seulement lorsqu'un stimulus spécifique est présent. De tels systèmes d'hydrogels intelligents ont été mis au point pour diverses applications comme des muscles artificiels (Suzuki, 1990) et comme matrice d'immobilisation pour des enzymes et des cellules (Hoffman, 2002; Park et Hoffman, 1993; 1990).

#### 1.6.2.1 Hydrogels thermosensibles

Les hydrogels thermosensibles sont la variante des hydrogels intelligents les plus utilisés et ils sont fabriqués avec des polymères dérivés du poly(N-isopropylacrylamide), poly(N,N-diéthylacrylamide), copolymères d'oxyde de poly(éthylène) et d'oxyde de

poly(propylène) qui ont comme caractéristique de changer de phase à une température critique. Ces polymères possèdent ce que l'on appelle une température critique basse en solution (LCST), cette température détermine la température maximale au dessous de laquelle il demeure soluble. C'est la présence dans ces polymères de groupements hydrophobiques qui induit l'insolubilité de l'ensemble suite à une élévation de la température. Ce mécanisme repose sur l'accroissement des interactions hydrophobiques dans le polymère et par un affaiblissement des ponts hydrogène. Il en résulte alors un rétrécissement de l'hydrogel et l'expulsion de l'eau contenu dans l'hydrogel dû à l'association plus intime entre les chaînes de polymère. Si les liens entre les chaînes de polymère ne sont pas de types covalents, il se produira une transition que l'on appelle solide-gélification (Qiu et Park, 2001). Des molécules modèles comme l'héparine ont été introduites dans un hydrogel à base d'un copolymère de poly(N-isopropylacrylamide) et de méthacrylate de butyl et par des variations en palier de la température de l'hydrogel, on induit la libération de l'héparine (Gutowska et *al.*, 1992). Les applications cliniques des gels à base de poly(N-isopropylacrylamide) sont limitées à cause de la toxicité des monomères et des agents de réticulation et de plus, le poly(N-isopropylacrylamide) n'est pas biodégradable.

Des copolymères à base d'oxyde de poly(éthylène) et d'oxyde de poly(propylène) comme le Poloxamère-407 satisfont les critères de biocompatibilité et de biodégradabilité recherchés pour l'utilisation *in vivo* des hydrogels. Ainsi, le Poloxamère-407, qui est liquide à basse température (4°C) se gélifie à température de la pièce. Suite à une injection sous-cutanée, il forme un gel qui se dissout lentement en libérant son contenu (Moghimi et Hunter, 2000). Il est utilisé pour la libération lente de peptides et protéines thérapeutiques comme l'interleukine-2 (Morikawa et *al.*, 1987), l'uréase (Fults et Johnson, 1990) et l'hormone de croissance humaine (Katakam et *al.*, 1997). Le polymère soluble sera éventuellement excrété par le rein. Des gels de poloxamère-407, incorporant des agents bactériostatiques et bactéricides, sont utilisés comme peau artificielle dans le traitement de brûlures au troisième degré. Dans cette application, le gel permettait de nettoyer les blessures dû à sa qualité de surfactant et contribuerait à la fermeture plus rapide de la plaie, en stimulant la production endogène de facteurs de croissance épidermale ou tout simplement en conservant la plaie humide (Nalbandian et *al.*, 1987).

### 1.6.2.2 Hydrogels pH-sensibles

Tous les hydrogels pH-sensibles contiennent des groupes acides (acide carboxylique, acide sulfonique) ou basiques (sels d'ammonium) qui acceptent ou libèrent des électrons en réponse aux changements de pH du milieu. Les polymères polyacidiques sont peu hydratés à pH acide car leurs groupes acidiques sont protonnés, donc neutres. Au fur et à mesure de l'ionisation des groupes acides, c'est-à-dire avec l'augmentation de pH, le polymère gonflera. Pour les polymères polybasiques, on observera le phénomène contraire, c'est-à-dire une augmentation de l'ionisation lors d'une diminution de pH (Kost et Langer, 2001). Ainsi l'acide polyacrylique (PAA) s'ionise et se dissout à pH élevé alors que le poly(N,N-diéthylaminoéthyl méthacrylate) (PDEAEM) s'ionise et se dissout à pH acide. Le gonflement des hydrogels sensibles au pH est modulable en fonction de leur composition polymérique.

Les hydrogels sensibles au pH ont été développés principalement pour des formulations orales. Le pH acide de l'estomac ( $<3$ ) et le pH neutre de l'intestin représentent des milieux différents et ceci peut être exploité pour la libération ciblée d'un principe actif dans le tractus gastro-intestinal. Ainsi de la caféine incorporée dans des hydrogels de copolymère de méthacrylate de méthyl et de N,N-diméthylaminoéthylméthacrylate (DMAEM) n'est pas libérée à pH neutre mais à un pH de 3-5 où le DMAEM est ionisé (Siegel et *al.*, 1988).

Au contraire, des hydrogels à base d'acide polyacrylique réticulés par des liens azoaromatiques ont été développés pour la libération spécifique de principe actif dans le côlon. Le gonflement de ces hydrogels dans l'estomac est négligeable et la libération du principe actif y est minimale. Le gonflement de l'hydrogel augmente en atteignant la région intestinale où le pH est neutre. Cependant, c'est seulement une fois arrivé au côlon que les liens azoaromatiques réticulant l'hydrogel seront dégradés par les azoréductases de la flore microbienne du côlon, provoquant la libération du principe actif. Cette libération peut être contrôlée par le pourcentage de réticulation de l'hydrogel (Ghandehari et *al.*, 1997). Des microparticules d'hydrogel de poly(méthacrylique-g-éthylène glycol) ont permis la libération d'insuline au niveau de l'intestin chez les rats diabétiques. Ces

rats traités ont vu leur glycémie réduite de 40% pendant une période de huit heures (Lowman et *al.*, 1999).

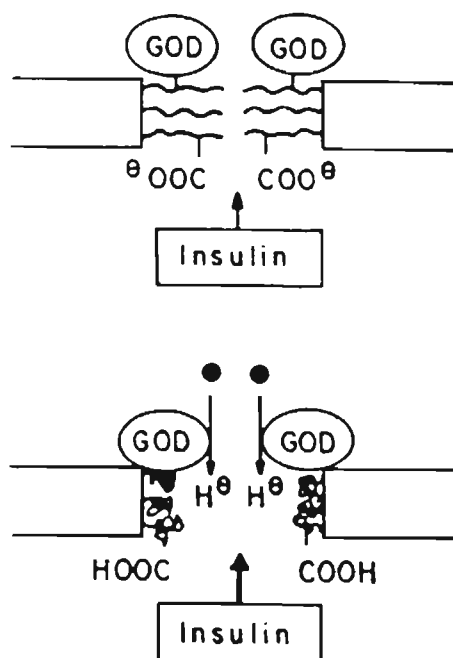
Un système plus sophistiqué a été développé et qui permet de libérer de l'insuline en fonction de la concentration de glucose sanguin. Le système est composé d'insuline, de l'enzyme glucose oxydase immobilisé dans un hydrogel sensible au pH à base de N, N-diméthylaminoéthylméthacrylate (DMA), d'hydroxyéthylméthacrylate (HEMA) et de tétraéthylène glycol diméthacrylate (TEGDMA). La présence d'une forte concentration sanguine de glucose cause une augmentation du sucre à l'intérieur de l'hydrogel, et il subit alors une transformation en acide gluconique par la glucose oxydase. La formation d'acide induit une diminution du pH à l'intérieur de l'hydrogel ce qui conduit au gonflement de l'hydrogel permettant la diffusion de l'insuline et de l'acide gluconique. Une diminution de la concentration de glucose diminue l'activité de la glucose oxydase et le pH revient vers des valeurs de pH neutres. L'hydrogel se déshydrate, bloquant la libération de l'insuline (Horbett et *al.*, 1984). Se basant sur les mêmes principes, Ito et *al.*, ont observé un comportement similaire lors de l'immobilisation de la glucose oxydase sur un gel d'acide poly(acrylique)-greffé sur une membrane de cellulose (Ito et *al.*, 1989) (Figure 8).

Une des limitations inhérentes à l'emploi des hydrogels sensibles au pH est la non-biodégradabilité des polymères synthétiques qui les composent.

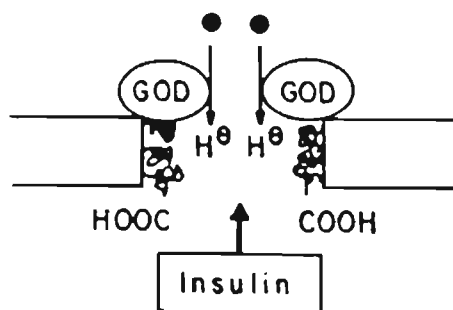
### 1.7 Biocompatibilité

La biocompatibilité se définit comme la capacité d'un biomatériau à remplir sa fonction sans engendrer d'effet indésirable chez son hôte. Cette propriété est essentielle pour éviter le phénomène de rejet du matériau ou des problèmes de toxicité. Durant des décades l'utilisation de biomatériaux polymériques était empirique, par la suite les chercheurs ont commencé à s'interroger sur les conséquences d'introduire un matériel étranger dans l'organisme à des buts thérapeutiques. Il est devenu évident que les caractéristiques structurales de l'implant, c'est-à-dire composition chimique, charge de

A)



B)



**Figure 8 :** Principe de libération contrôlée d'un système insuline/glucose oxydase. A) En absence de glucose et à un pH neutre, les chaînes d'acide polyacrylique sont non protonnées ( $\text{COO}^{\ominus}$ ), elles ont une structure en bâtonnet qui diminue la porosité de la membrane et supprime la diffusion de l'insuline. B) En présence de glucose (●), l'acide gluconique produit par la glucose oxydase (GOD) protonne les chaînes d'acide polyacrylique provoquant l'affaissement de ces dernières. Il s'ensuit une augmentation de la porosité de la membrane qui permet la diffusion de l'insuline. Tiré de Ito Y. et *al.* (1989) *J. Control. Rel.* **10**, 195-203.

surface, porosité, taille et forme, sont les facteurs importants déterminant la biocompatibilité (Anderson, 1993).

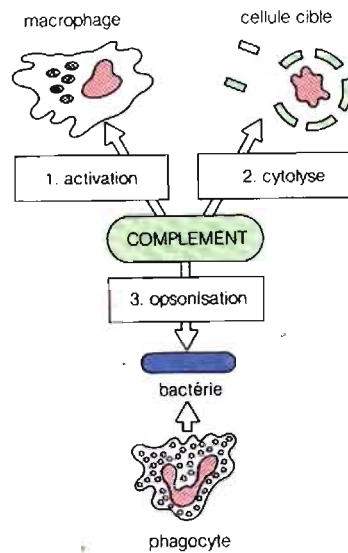
En termes pratiques, la biocompatibilité d'un matériau polymérique (implants, microparticules) s'évalue *in vivo* et elle se caractérise par la réponse de l'hôte qui peut se manifester de plusieurs manières.

### 1.7.1 Activation du complément

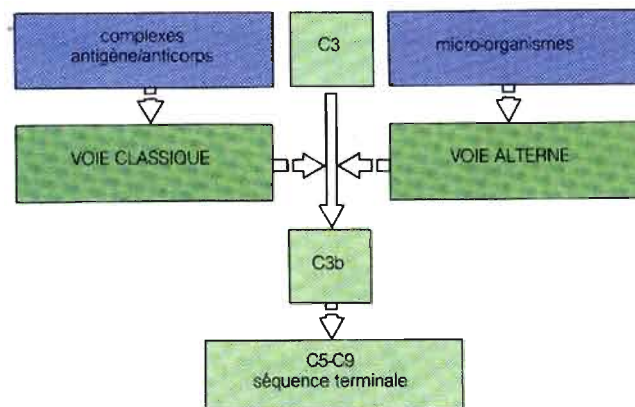
La compatibilité sanguine est déterminée par les interactions à l'interface sang/biomatériau qui dépendent de la structure chimique de surface du matériau. L'hémo-incompatibilité implique l'activation du complément, la stimulation de la coagulation sanguine et l'adsorption de protéines sur l'implant.

Le système du complément consiste en une cascade de protéines sériques et de protéines plasmatiques régulatrices qui sont activées au contact du sang avec un matériel étranger (Figure 9). Le système du complément s'active par la voie alterne ou par la voie classique (Figure 10). L'activation par la voie classique est souvent initiée par un complexe antigène-anticorps mais aussi par des surfaces virales ou bactériennes ou par le contact du sang avec certains matériaux polymériques et cela en absence d'anticorps spécifiques (Maillet *al.*, 1990). La capacité d'activation du complément par certaines surfaces est modulée par des anticorps spécifiques. Maillet et *al.* ont montré que IgG convertissait des surfaces inertes en surfaces activatrices du complément, en procurant des sites additionnels pour la fixation de C3b (Maillet et *al.*, 1990). Le degré d'activation du système dépend de la nature du matériau utilisé. Sawata et *al.* ont suggéré que la teneur en atomes d'oxygène de la composition de la surface du matériau serait un indicateur important de l'hémocompatibilité. Généralement des pourcentages élevés d'oxygène sont associés avec une plus faible adsorption protéique à la surface et le matériau active peu le système du complément (Sawata et *al.*, 1993).

L'adsorption de protéines plasmatiques en surface de biomatériaux polymériques est un facteur important qui caractérise une faible biocompatibilité. Stanislawski et *al.* en 1995 ont identifié les protéines plasmatiques adsorbées sur quatre fibres polymériques à base d'acide poly(lactique), de poly(arylamide), de polyester et de poly(propylène). La proportion de protéines liées diffère selon la nature du polymère. Il existe une relation



**Figure 9 :** Les principales fonctions du système du complément. (1) activation du système immunitaire; (2) lyse des cellules cibles; (3) opsonisation où le complément facilite la phagocytose, par exemple des bactéries. Tiré de Roitt I., Brostoff J. et Male D. (1985) Immunologie fondamentale et appliquée.



**Figure 10 :** Comparaison des voies classique et alterne d'activation du complément. Les 2 voies génèrent une convertase de C3 qui clive C3 en C3b, élément central de l'activation du complément. C3 active à son tour la séquence terminale lytique, C5 à C9. Tiré de Roitt I., Brostoff J. et Male D. (1985) Immunologie fondamentale et appliquée.



inversement proportionnelle entre la liaison de la lipoprotéine ApoA-1 et la liaison de la fibrinogène. Le poly(arylamide) lie une grande quantité de fibrinogène mais très peu d'ApoA-1 alors que l'acide poly(lactique), le polyester et le poly(propylène) lient une grande quantité d'Apo-1 mais très peu de fibrinogène. L'affinité du fibrinogène pour le poly(arylamide) favorise l'adhérence des fibroblastes sur la fibre (Stanislawski et *al.*, 1995). La conformation, l'orientation et la concentration des protéines adsorbées (fibrinogène, fibronectine) qui interagissent avec les récepteurs des plaquettes sanguines sont des facteurs qui contribuent à la biocompatibilité des matériaux à cause de leur influence sur l'activation et l'adhésion plaquettaire (Sheppard et *al.*, 1994).

### 1.7.2 Réponse inflammatoire

L'implantation ou l'injection d'un vecteur thérapeutique induit une réponse inflammatoire dont le degré varie avec la nature du biomatériau. Celle-ci implique des composantes vasculaire, humorale et cellulaire identiques à celles provoquées par une infection microbienne ou un traumatisme physique.

La mise en place d'un implant cause un traumatisme résultant du bris des tissus conjonctifs vascularisés. Ce traumatisme est suivi par la coagulation du sang, l'activation des plaquettes et la formation d'un thrombus. La première phase de l'étape de guérison consiste en une inflammation aiguë qui se caractérise par l'arrivée des neutrophiles et des monocytes au site par transmigration au travers de l'endothélium vasculaire. Les neutrophiles ont pour rôle d'éliminer les bactéries et le matériel étranger présents au site. Les macrophages procèdent quant à eux à la résorption du tissu nécrotique et à la phagocytose du matériel étranger. De plus, ils libèrent des facteurs de croissance nécessaires à la régénération tissulaire. Par ailleurs, si il y a adsorption d'opsonines (protéine C3 du complément et IgG) en surface du biomatériau, il y aura liaison sur le biomatériau des neutrophiles et macrophages par leurs récepteurs à opsonines. Il s'ensuivra une activation de ces cellules qui induira alors la sécrétion d'espèces oxygénées réactives, d'enzymes protéolytiques et la phagocytose de l'implant. S'il y a persistance du stimulus inflammatoire, on parlera alors d'une inflammation chronique qui est caractérisée par la présence de macrophages, de monocytes et particulièrement de lymphocytes. Lors de la phase finale de la guérison, si l'implant ne peut être phagocyté, il

se formera des corps cellulaires géants ainsi qu'une capsule fibreuse autour de l'implant pour l'isoler des tissus environnants (Babensee et *al.*, 1998).

L'inflammation aiguë est la première réponse de l'organisme pour éliminer le matériel étranger. Elle se caractérise par une altération significative de plusieurs protéines plasmatiques dites protéines de phase aiguë (APP). Ces dernières regroupent un ensemble hétérogène de protéines plasmatiques impliquées dans plusieurs fonctions. Elles régulent la réponse immune, la coagulation, la fibrinolyse, l'activation du complément, les activités opsonique et chimiotactique (Kushner, 1982). Lors de la réponse de phase aiguë, la production des protéines dites positives augmente (sérum amyloïde A, protéine réactive C, fibrinogène, C3, haptoglobine) et celle des protéines dites négatives diminue (albumine, transferrine). Cependant, il existe des variations d'une espèce à l'autre (Baumann et Gauldie, 1990). Les protéines de phase aiguë sont produites dans le foie et leur synthèse est régulée par un réseau complexe de cytokines.

Les cytokines sont des médiateurs chimiotactiques produits localement au site d'une inflammation par les macrophages activés, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Les principales cytokines sont l'interleukine-1 (IL-1), l'interleukine-6 (IL-6) et le facteur alpha de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ) (Baumann et Gauldie, 1990). Ces médiateurs sont impliqués dans la phase aiguë de l'inflammation particulièrement, IL-6, qui stimule la synthèse des protéines de phase aiguë (Heinrich et *al.*, 1990). L'IL-1 est un médiateur important dans la réponse immune à composante cellulaire et joue un rôle clé dans la détermination de la biocompatibilité d'un matériau. Suite à une stimulation, les monocytes/macrophages sécrètent IL-1, un immunomodulateur non-spécifique qui stimule à son tour une variété de cellules impliquées dans le processus inflammatoire. IL-1 induit aussi le catabolisme des protéines de matrice et elle régule la phase de réponse aiguë (Dinarello, 1984). La fonction la plus importante de IL-1 est la stimulation de la production de l'interleukine-2 (IL-2) par les lymphocytes T. Le TNF- $\alpha$  est un modulateur multipotent du système immunitaire et est sécrété par les leucocytes. Il interagit spécifiquement avec les cellules endothéliales induisant une activité procoagulante et la libération d'IL-1 (Nawroth et *al.*, 1986). L'activation des fragments du complément induit la sécrétion de TNF- $\alpha$  ce qui provoque la production de superoxyde par les neutrophiles (Tsujimoto et *al.*, 1986).

### 1.7.3 Interactions microsphère/tissus : cas des microsphères de PLA/PLGA

L'injection de microsphères en sous-cutané ou en intramusculaire résulte en l'implantation d'un biomatériau avec un rapport surface/volume élevé dans un tissu donné. La réaction de l'organisme en réponse à cette injection se divise en trois grandes phases. La Phase I qui se produit dans les deux semaines suivant l'injection, et qui inclut l'initiation et l'organisation des réponses inflammatoires chronique et aiguë. Dans les 48 premières heures de cette phase, on observe une réponse inflammatoire minimale et une faible présence de leucocytes et de lymphocytes. Après trois à cinq jours, les monocytes différenciés en macrophages prédominent au site d'injection. Cette abondance de macrophages précède la Phase II, au cours de laquelle, ces cellules fusionnent pour former des corps cellulaires géants à l'interface tissu/microparticule. Il y a également une infiltration de fibroblastes sécrétant du collagène, le principal composant de la capsule fibreuse. La Phase III se caractérise par la dégradation en petits morceaux des microparticules injectées. La formation de ces morceaux initie alors une réponse cellulaire où les macrophages prédominent ce qui accélère la biodégradation des microparticules. La durée de la phase III est fonction de la vitesse de dégradation du polymère (Anderson et Shive, 1997).

L'intensité de la réponse inflammatoire et de la formation de corps cellulaires géants varient avec la voie d'administration comme l'ont démontré les études effectuées par Spenlehauer et *al.*. Vingt-quatre heures après l'injection embolisante de microsphères de PLGA (40-100µm) dans la veine portale de rats aucune inflammation purulente ou hémorragie du tissu hépatique ne sont induites. Trois semaines après l'embolisation, des microparticules intactes sont encore détectées et très peu de macrophages et de lymphocytes sont observés au site. Après douze semaines, la résorption des microsphères est complétée (Spenlehauer et *al.*, 1989). Saitoh et *al.* ont mené une étude sur l'efficacité de microsphères de PLA contenant la protéine morphogénique osseuse, qui accélère la régénération osseuse. Les microparticules ont été implantées en sous-cutané sur les muscles intercostaux de rats. L'analyse histologique révèle après deux semaines la formation de cartilage. A six mois, la formation intensive d'os et de moelle osseuse est observée. Les particules ont été graduellement absorbées et disparaissent après vingt-

quatre semaines, remplacées par du tissu conjonctif (Saitoh et *al.*, 1994). Ogura et Kimura ont utilisé des microparticules de PLGA pour cibler l'épithélium de la rétine. Quatre semaines après l'implantation, l'analyse histologique révèle la présence des microsphères qui ont été phagocytosées par l'épithélium de la rétine. Cependant aucun effet indésirable ou de réactions tissulaires ne sont détectés (Ogura et Kimura, 1995). Des études de biocompatibilité de microsphères de PLGA de 22µm implantées dans le striatum du cerveau de rat, montrent après vingt-quatre heures que les microsphères sont entièrement entourées par la microglie et des macrophages. Trente jours plus tard, la réaction cellulaire diminuait de manière significative et à soixante jours la réponse cellulaire était terminée. Des études immunohistochimiques révèlent l'absence de lymphocytes T tout au long de l'étude (Menei et *al.*, 1993). Les études citées dans ce paragraphe, ont utilisé des microparticules de taille supérieure à 10µm, taille qui ne permet pas leur phagocytose.

### 1.8 Objectifs du projet

L'une des limitations majeures de l'hydrogel obtenu par réticulation chimique d'albumine et de poly(éthylène glycol) lorsqu'utilisé sous forme d'implants macroscopiques est la formation d'une capsule fibreuse. Cette dernière perturbe les échanges entre l'implant et le milieu environnant, diminuant significativement l'efficacité de l'implant après une semaine. De plus, l'implant ne peut être dégradé. En changeant la formulation de l'hydrogel et la méthode de synthèse, il est possible d'obtenir des microparticules dont la taille varie entre 3 et 15 microns.

Ce projet poursuit quatre objectifs principaux

- 1) Synthétiser des microparticules hydrophiliques de taille diverses à base de PEG et d'albumine. De telles particules combinent un double avantage : une forte hydrophilicité et une faible immunogénicité. Leur forte teneur en eau permet l'encapsulation de protéines et de peptides sous leur forme native en évitant les risques de dénaturation causées par la lyophilisation ou des solvants organiques lors de l'emploi de particules plus hydrophobes. La présence de PEG, un

polymère non-immunogénique, et d'albumine compatible avec l'hôte diminue les chances d'une réponse immune contre la matrice de ces microparticules. De plus en fonction des applications spécifiques *in vivo*, il est désirable de pouvoir moduler la taille des microparticules. Ainsi pour l'administration pulmonaire, des microparticules de 3µm sont préférables alors que celles de 10µm sont compatibles pour des injections dans la cavité péritonéale. Une fois les paramètres de synthèse optimisées, les performances des microparticules de 3µm et 10µm seront testées par voie intraveineuse chez le rat.

- 2) Évaluer la compatibilité de ces microparticules pour l'administration par voie intraveineuse chez le rat. A cause de l'absence de phase d'absorption et de la génération immédiate de l'effet thérapeutique, l'injection par voie intraveineuse demeure une voie d'administration intéressante pour les micro-, nanoparticules. L'utilité de ces dernières est de protéger contre l'inactivation biologique et d'augmenter le temps de résidence dans la circulation sanguine des entités thérapeutiques présentes dans leur matrice. Ceci implique que les particules en question puissent se dérober à l'action du système réticulo-endothélial (SRE). Celui-ci filtre, au niveau du foie et de la rate, toute particule étrangère présente dans le sang particulièrement celles avec des surfaces hydrophobes ou chargées négativement. L'augmentation de l'hydrophilicité de surface d'une micro-, nanoparticule par la présence de PEG ou de surfactants (poloxamères, poloxamines) permet effectivement de retarder l'action de SRE. Il en résulte une plus forte concentration de ces particules dans la circulation sanguine et une filtration moindre au niveau du foie. L'effet d'une augmentation de l'hydrophilicité par greffe de PEG, de l'hydrophobicité par greffe de lipides de même que la diminution de la charge négative de surface par amination sera évaluée avec les microparticules de PEG-albumine de 3µm. Des études de distribution avec les différentes microparticules permettront de déterminer les paramètres pharmacocinétiques et d'évaluer le temps de résidence plasmatique des particules.

- 3) Évaluer la biocompatibilité de diverses formulations de microparticules de  $3\mu\text{m}$  par injection intrapéritonéale chez le rat. La cavité intrapéritonéale, du fait de son isolement par rapport aux sites corporels, représente un site idéal pour l'étude des réactions cellulaires ou biochimiques provoquées par l'insertion d'un implant. Pour des formulations particulières, l'obstacle principal sera représenté par les macrophages péritonéaux. Ces cellules dans leur forme quiescente sont peu actives mais en présence de particules étrangères leur nombre augmente, leur activité phagocytaire s'accroît et leur activité métabolique change. On déterminera par les études de biocompatibilité intrapéritonéale si la matrice des microparticules de PEG-albumine possèdent une bonne compatibilité et ce, en se basant sur le niveau d'activation des macrophages quiescents péritonéaux.
- 4) Evaluer l'efficacité thérapeutique de microparticules de  $3\mu\text{m}$  de PEG-albumine chargées d'insuline et administrées par voie pulmonaire chez le rat diabétique. La cavité pulmonaire de par ses caractéristiques (pH neutre, activité protéolytique moindre) représente un bon site pour l'administration de protéines ou peptides bioactives comme la calcitonine ou l'insuline. Malgré une phase d'absorption relativement courte, les macromolécules libres n'en demeurent pas moins vulnérables à l'inactivation. Une matrice polymérique permettrait de protéger la macromolécule bioactive contre la protéolyse ou tout autre mécanisme d'inactivation en plus de contrôler sa libération. Ces deux caractéristiques des microparticules se conjuguent pour prolonger l'effet thérapeutique. Les microparticules peuvent donc améliorer l'effet d'un médicament administré par voie pulmonaire mais leur nature particulière risque de susciter une réponse inflammatoire. En utilisant le rat diabétique comme modèle, l'effet des microparticules de  $3\mu\text{m}$  de PEG-albumine chargées d'insuline sera étudiée sur la glycémie (effet thérapeutique) et la réponse pulmonaire au niveau cellulaire et biochimique. Ceci permettra de valider l'utilisation de ces microparticules pour des études ultérieures plus poussées.

## 2.0 Section expérimentale

Cette section est composée de 4 publications qui regroupent la méthodologie, l'ensemble des résultats obtenus et la discussion reliée aux résultats. Les publications seront soumises très prochainement au journal *Biomaterials*.

La première publication contient les données relatives à la synthèse des microparticules d'hydrogel ainsi que l'évaluation de l'influence des divers paramètres de synthèse sur les caractéristiques physico-chimiques des microparticules obtenues.

La deuxième publication évalue chez le rat la biodistribution et l'élimination de la circulation sanguine de diverses préparations de microparticules d'hydrogel d'albumine-PEG de 3µm de diamètre administrées par injection intraveineuse.

La troisième publication examine chez le rat la réponse cellulaire et biochimique à court terme de microparticules à base d'albumine de rat et de PEG de 3µm de diamètre injectées dans la cavité péritonéale.

La dernière publication évalue dans un premier temps la réponse cellulaire et biochimique à court terme de microparticules d'hydrogel d'albumine de rat et de PEG de 3µm de diamètre administrées par instillation intratrachéale chez le rat sain. Dans un deuxième volet l'effet hypoglycémique de ces microparticules d'hydrogel chargées avec de l'insuline et administrées par instillation endotrachéale sera étudiée chez le rat diabétique.

## Manuscripts

### **2.1- Synthesis and *in vitro* characterization of Poly(ethylene glycol)-albumin hydrogel microparticles .**

P. He, J. Jean-François and G. Fortier (2004)

Participation à la réalisation des expériences : Stabilisation des microparticules de 3µm.

### **2.2- Hydrogel microparticles of PEG-albumin: Influence of size and surface nature on their biodistribution and elimination in rat.**

J. Jean-François, Y. Liu and G. Fortier (2004)

Participation à l'élaboration de protocole et à la réalisation des expériences et rédaction de l'article.

### **2.3- Cellular and biochemical short-term responses to RSA-PEG hydrogel microparticles injected in the rat peritoneum.**

J. Jean-François and G. Fortier (2004)

Élaboration du protocole, réalisation des expériences et rédaction de l'article.

### **2.4- Instillation of RSA-PEG hydrogel microparticles in lungs of normal and diabetic rats.**

J. Jean-François and G. Fortier (2004)

Participation à l'élaboration du protocole, réalisation des expériences et rédaction de l'article.



## **Synthèse et caractérisation *in vitro* de microparticules d'hydrogel de poly(éthylène glycol)- albumine.**

P. He, J. Jean François and G. Fortier \*

Laboratoire d'Enzymologie Appliquée,  
Département de Chimie-Biochimie, Université du Québec à Montréal,  
C.P. 8888, succ. Centre-Ville, Montréal (Québec), Canada H3C 3P8

Des microparticules d'hydrogel avec un contenu élevé en eau ont été obtenues par une réaction de réticulation entre l'albumine et du poly(éthylène glycol) activé (PEG<sub>a</sub>). L'influence des divers paramètres de synthèse tels que la source d'huile et d'albumine et le poids moléculaire du PEG sur les caractéristiques physico-chimiques des microparticules a été évaluée. Le contenu en eau des microparticules varie entre 95% et 98% et augmente avec un accroissement du poids moléculaire de PEG. Aux conditions optimales de synthèse, des microparticules de 3 à 50µm de diamètre ont été préparées. Ces microparticules ont une charge de surface négative. Elles se dispersent très bien dans une solution de PBS et sont stables car on n'observe pas d'aggrégation des microparticules dans un intervalle de temps variant entre 1 et 10 mois. La vitesse de rotation initiale lors de la synthèse et le poids moléculaire du PEG utilisé sont les deux paramètres affectant la taille des microparticules. Dans des conditions de synthèse identiques, la taille des microparticules préparées avec du PEG 20kDa est 5 fois plus élevée que celle des microparticules préparées à partir de PEG 2kDa. Les albumines porteuses de chaînes oligosaccharidiques induisent l'aggrégation des microparticules.

## **Synthesis and in vitro characterization of Poly(ethylene glycol)-albumin hydrogel microparticles**

P. He, J. Jean François and G. Fortier \*

Laboratoire d'Enzymologie Appliquée,  
Département de Chimie-Biochimie, Université du Québec à Montréal,  
C.P. 8888, succ. Centre-Ville, Montréal (Québec), Canada H3C 3P8

**Keyword :** Hydrogel, microparticle, high water content, particle size, albumin, poly(ethylene glycol), enzyme immobilization, controlled delivery.

**Short running title:** *Synthesis* of PEG-BSA microparticles.

\* to whom correspondence should be sent

Dr G. Fortier  
Laboratoire d'Enzymologie Appliquée  
Université du Québec à Montréal  
C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal (Québec),  
Canada H3C3P8  
Tel : 514-987-3000 ext. 4455  
Fax: 514-987-4054  
fortier.guy@uqam.ca

**ABSTRACT**

Hydrogel microparticles of high water content based on the crosslinking of albumin with activated poly(ethylene glycol) were synthesized. The effects of different synthesis parameters on the physicochemical characteristics of the microparticles, such as the sources of oil and albumin and the molecular weight of PEG, were evaluated. The water content of the microparticles ranged from 95% to 98%, increasing with an increase of the molecular weight of PEG. At optimal conditions, microparticles with a size of 3 to 50  $\mu\text{m}$  were prepared. These microparticles showed a negatively charged surface. They were freely dispersed in PBS buffer and stable. Initial stirring speed and PEG molecular weight affected the size of the microparticles. Under the same preparation conditions, the size of the microparticles synthesized from 20 kDa PEG was 5 times larger than the size of microparticles prepared from 2 kDa PEG. Albumin containing sugar side chains can result in aggregation of the microparticles. The albumin-PEG hydrogel microparticles showed a good storage stability, meaning no aggregation, ranging from 3 to 10 months. Because of these properties these microparticles might be considered for biomedical applications.

## INTRODUCTION

Applications of polymeric systems, particularly those made of polymeric microspheres for delivery of bioactive agents, are a new trend in biomedical and biopharmaceutical R&D activities. Over the conventional dosage forms, these delivery systems have the advantages of sustained and site-specific delivery of active agents [1], in order to improve the drug absorption and bioavailability and to reduce the adverse side-effects [2, 3]. These systems are particularly useful for the delivery of proteins, peptides, antigens and enzymes [4-7].

A polymeric microsphere system is generally made of a polymeric material, which acts as a delivery vehicle, and an active component. Selecting a suitable polymer is of the utmost importance because it can affect the biological and physicochemical behaviours of the microparticles such as biocompatibility, drug release rate and distribution. A desirable polymer should be biocompatible, biodegradable, non-toxic, with the ability to control the release rate; it should also have high drug loading capacity and be pharmaceutically stable. Synthetic biodegradable polymers, such as poly-lactic acid (PLA) and its derivative poly-lactic co-glycolic acid (PLGA) have been frequently studied [8, 9]. These polymers can be tailored for controlled release of drugs and they are the only polymers currently approved for use in humans [10]. However, the stability of some bioactive agents, such as proteins and peptides could be affected during the degradation of this material. When PLA or PLGA are degraded, lactic and glycolic acid are produced. The surrounding environment becomes extremely acidic, which could lead to the inactivation of proteins and peptides [11, 12]. Some natural materials, such as polysaccharides were reported to be non-toxic or to have low toxicity. It is believed that

the low toxicity of these materials could be only referred to the delivery of drugs via non-parenteral routes such as the gastrointestinal tract (GIT). When these materials are intended to be used for parenteral routes, e.g., as an injectable formulation, the toxicity of these materials has to be carefully evaluated. Therefore, synthesizing and utilizing new polymeric materials for controlled delivery has attracted a lot of attention.

A hydrogel is a three-dimensional polymeric biomaterial, which has the ability to absorb a large amount of water [13]. It is biocompatible and permeable to small molecules. Synthesis of hydrogels into micron size microparticles, however is difficult, particularly for those with high water contents. Firstly, it is difficult to prepare and stabilize hydrogel microparticles of micron size. Secondly, hydrophilic hydrogel micron-sized particles easily aggregate. However, hydrogel microparticles can be a good matrix for immobilization of enzymes and delivery of bioactive agents. Site specific delivery can be achieved by using microparticles of different sizes. Due to the extremely large surface area, the activity of the active agent (e.g., an immobilized enzyme) could be enhanced.

A family of bioartificial hydrogels based on the crosslinking of albumin with poly(ethylene glycol) (PEG) has been introduced by our group several years ago [14-15]. It contains about 95% of water and still possesses good mechanical properties [16]. It is biodegradable and biocompatible. These hydrogels have proven to be a very good polymeric matrix for immobilization of various enzymes [17-18] and as devices for controlled drug release [19]. We would like to formulate the hydrogel into microparticles of different sizes for specific applications *in vivo*. In this study, the PEG-albumin hydrogel microparticles have been synthesized by an emulsion-suspension-polymerization method. Preparation parameters such as the oil used, the stirring speed,

the molecular weight of PEG and the source of albumin were investigated for their influence on the physicochemical characteristics of the microparticles. Microparticles were characterized according to their size and water content.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **MATERIALS**

PEGs of 3.35 and 8 kDa were obtained from Polysciences Inc. (Warrington, USA). Bovine serum albumin (BSA, ~99%), rat serum albumin (fraction V), ovalbumin (grade V), PEG of 1.45, 10 and 20 kDa, Woodward's Reagent K (WRK), 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS), mineral oil (heavy white oil) and cottonseed oil were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). PEGs of 2 and 4.6 kDa and 4-nitrophenyl chloroformate were from Aldrich (St Louis, MO, USA). Pea-albumin was from Coletica (France). Cottonseed oil (refined) was purchased from ACP Chemicals Inc. (Montréal, Canada), and was free of particles by centrifuging at 4000 rpm for 20 min. Corn oil was from Mazola (Ontario, Canada). Vegetable oil was from Crisco (Toronto, Canada). All other chemicals and biochemical reagents were of the purest grade available.

### **METHODS**

#### **Synthesis of PEG-Albumin hydrogel microparticles**

PEGs were activated with 4-nitrophenyl-chloroformate and PEG-albumin hydrogels were synthesized by crosslinking albumin with activated PEG (PEG<sub>a</sub>), as previously described [14]. A w/o emulsion-suspension-polymerization method was used to prepare PEG-albumin hydrogel microparticles. The aqueous phase (1 ml of 400 mM

borate buffer, pH 9.4) contained 100 mg of protein (albumin) and different amounts of the activated PEG (PEG<sub>a</sub>), which was taken according to the optimum molar ratio of OH/NH<sub>2</sub> (activated OH groups on PEG versus accessible free NH<sub>2</sub> groups on the albumin) as described before [14]. The continuous oil phase was composed of 165 ml of cottonseed oil containing 0.4 ml of triethyl amine (TEA). An emulsion was formed by dispersing the water phase into the oil phase with a mechanical stirrer (Servodyne Mixer Head, Model 50000-40, Cole-Parmer Instrument Co., Illinois, USA) at a high speed (4000rpm or 2000rpm). Thirty min later, the stirring rate was reduced to 1200 rpm and kept constant for a total of 4 h. When the polymerization reaction was completed, the suspension was centrifuged at 3400 rpm for 10 min (IEC Centra-4B Centrifuge, International Equipment Company, USA). Microparticles were separated from the supernatant and washed 4 times with phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 (137mM NaCl, 5mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). The supernatant buffer solutions were collected for evaluation of PEG and protein release during the washing process. Microparticles were harvested in PBS buffer and stored at 4°C. All microparticle preparations done in triplicate.

### **Characterization of microparticles**

The particle size of hydrogel microparticles was monitored using an optical microscope during the preparation process. At the end, the particle size of the harvested hydrogel microparticles was measured using a Malvern particle size analyzer (Malvern 2600 Power Module, England) and a Mastersizer S (Malvern Instruments Inc.,

Southborough, USA). The volume mean diameter (VMD) and Span were determined.

The Span which assesses the size distribution is defined by equation 1:

$$\text{Span} = \frac{D(90) - D(10)}{D(50)} \quad (1)$$

Where D(90), D(50) and D(10) are the 90th, 50th and 10th percentiles of the particles according to size, respectively. The smaller the Span value, the narrower is the size distribution. Stability of the microparticles was evaluated by measuring in time (1 to 10 months) their size and span.

Microparticle morphology and dispersibility (lack of aggregation) was evaluated using an optical microscope. Their zeta potential was determined in three buffers 0.001 M pH 4.0 acetate buffer, 0.001 M pH 7.0 phosphate buffer and pH 8.0 phosphate buffer containing 0.05 M NaCl using a Microelectrophoresis Apparatus MK II (RANK Brothers Ltd, UK). Ten runs were made per sample and means were calculated.

The equilibrium water content (EWC) defined as equation 2 was determined:

$$\text{EWC} = \frac{(W_s - W_d)}{W_s} \times 100\% \quad (2)$$

where  $W_s$  is the final weight after swelling and  $W_d$  is the dry weight of the hydrogel.

### **Evaluation of PEG and protein release**

Microparticle washing solutions were extracted three times with pentane to remove the residual oil and analyzed for PEG and protein contents using an iodine reagent [20] and micro BCA assay [21], respectively.



### **Estimation of free amino groups and free carboxyl groups**

Free amino group content of albumin and hydrogel microparticles were measured using a TNBS method [22]. Free carboxyl groups were modified using Woodward's reagent K (WRK) [23].

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Water content of microparticles**

One of the most significant characteristics of PEG-albumin hydrogel is its high water content. The water content (EWC) of the hydrogel microparticles made from BSA is similar (Table 1) to that of the hydrogel films and reached 95% (w/w) as published before [14, 15]. The water content was affected by the M.W. of PEG (Table 1). By increasing the M.W. of PEG, the water content of the hydrogel was increased and the solid part decreased. The solid part of the hydrogel made of 20 kDa PEG was about 1.7%, whereas the solid part of the hydrogel composed of 2 kDa PEG increased to 5.6% representing a 3-fold increase. This results from the interaction of water with PEG. Several forms of water have been found after dissolution of PEG in water [16], the free water and PEG-bound water [24]. Since the PEG moiety is responsible for the swelling of the hydrogel in water, the water content should be proportional to the number of ethoxy repeat units.

### **Effect of the source of albumin on microparticles characteristics**

The type of albumin also influenced the EWC value of the hydrogel microparticles. Bovine and rat albumins are composed of amino acids only, whereas

ovalbumin and pea albumin are glycoproteins containing as much as 25% and 40% of carbohydrates, respectively. Therefore in similar synthesis conditions, hydrogels synthesized from pea and egg albumins had higher water content compared to bovine and rat albumin leading to a more important swelling of the microparticles. (Table 2) In accordance pea-albumin (25 kDa), the smaller protein but with very high carbohydrate content (40%), gave microparticles which were 2 times larger than for serum albumin (Table 2). The effect of the carbohydrates is similar to the effect of PEG and increases the hydrophilicity of the synthesized microparticles. However, the presence of carbohydrate chains seems to favour aggregation of the microparticles as indicated by an important increase in their span values (Table 2).

### **Effects of synthesis parameters on the size of the microparticles**

An emulsion-suspension-polymerization method was used to synthesize the PEG-albumin hydrogel microparticles. The hydrogel being hydrophilic in nature, a water in oil (w/o) emulsion method was employed to prepare the microparticles. The polymeric material which is soluble in water, is dispersed as the aqueous internal phase. Once the discontinuous aqueous phase is formed and well isolated under droplet form by the oily continuous phase, stabilized microparticles can be obtained.

Mineral oil, corn oil, vegetable oil, and cottonseed oil were tested as the continuous phase. Spherical microparticles (Fig. 1) were only obtained when cottonseed oil was used (Table 3). When mineral oil, corn oil or vegetable oil were used for the emulsification process, the droplets of polymeric material aggregated together, even if Span 80, a surfactant, was added as an emulsifying agent. Therefore, cottonseed oil was used as the continuous phase in the following studies.

It is well known that stirring speed influences significantly the size of the microparticles prepared by an emulsification method. So it was possible to prepare hydrogel microparticles with different sizes by varying the stirring rate. The results are shown in Table 4. Hydrogel microparticles made with BSA and showing good dispersibility were produced with a size ranging from 2.75  $\mu\text{m}$  to 25  $\mu\text{m}$  when the stirring rate was decreased from 4000 to 1400 rpm. Generally, the size volume follows a normal and narrow distribution as shown in Fig. 2. The span value was calculated for the various microparticles and it ranges from around 0.6 to 1.1.

The effects of M.W. of PEG on the size of the microparticles was studied using an optimal concentration ratio of reagents at 2000 rpm. The results are described in Table 1. A relationship is observed between the microparticle size and the M.W. of PEG. The size of the microparticles is increasing when M.W. of PEG increases. There are two main explanations for this observation. The first one is related to the viscosity of the PEG reagent solution at optimal ratio, which is given in Fig 3, and it shows that the viscosity increases along with the M.W. of PEG, especially when M.W. exceeds 8 kDa. During the emulsification process and under a constant shearing force, the size of the droplets formed will increase with the increase of the internal phase viscosity as described by Arshady [25]. The second factor influencing the size of the microparticles is related to the percentage of cross-linking which is dependent also on the M.W. of PEG. As we described earlier for hydrogel slabs [14-16], the number of PEG chains that anchored the BSA macromolecules decreased with the length of chain. A high M.W. of PEG creates greater steric hindrances, resulting in a lower crosslinking between BSA macromolecules. During the swelling process, expansion of the microparticle diameter will be accentuated

by the length of PEG chain. This is corroborated by the increase of the EWC observed when higher M.W. of PEG were used (Table 1). For example, the size of the hydrogel microparticles made from 20 kDa PEG was 50  $\mu\text{m}$  compared to 10  $\mu\text{m}$  size for the microparticles obtained with 2 kDa PEG. It has to be noted that a hydrogel was not obtained with PEG of M.W. of 1.45 kDa or less. For the microparticles synthesized with 1.45 kDa PEG, the size was larger than that of microparticles composed of 2 kDa PEG. The particles obtained were not stable and easily aggregated. The size of the aggregated microparticles was larger causing a high value of the span value (2.53).

We evaluated the influence of the molar ratio of the activated carbonate groups of PEG to accessible amino groups of albumin on the size of the hydrogel microparticles and on the amount of unreacted reagent. The hydrogel microparticles were synthesized from 8 kDa PEG and 3.4 kDa PEG, respectively. The results are shown in Table 5. The microparticles size was increased when the molar ratio decreased. Obviously, the cross-linking extent of the hydrogel depended on the molar ratio. The microparticles were less crosslinked when the amount of activated PEG was reduced as determined by the percentage of free amino groups. In this situation, the microparticles swelled more and became larger. Further evidence for the different cross linking extents can be found in the free amino groups of the microparticles at different molar ratios. For the microparticles synthesized from 8 kDa PEG at the ratio of 2:1 and 0.7:1, for instance, the percentages of the free amino groups were 47.4 and 85.2, respectively and the microparticle sizes were 24.55  $\mu\text{m}$  and 45.39 $\mu\text{m}$  respectively. The size of the less reticulated microparticles was larger. Similar results were obtained from the microparticles synthesized from 3.4 kDa PEG. When the excess of PEG is too high, the microparticle size increases due to a

decrease in the crosslinking. Effectively, at high molar ratio, the probability that the two extremities of PEG chains were linked to albumin macromolecules is lower, leading at a discrete ratio to the absence of hydrogel formation. Similar observations were detailed with hydrogel film synthesis [14-16].

### **Release of PEG and albumin**

During the washing of the microparticles, unbound reagents such as albumin and PEG are released into the washing medium [14]. By evaluating the amount of unbound reagents released, one can evaluate the composition of the hydrogel. At optimal molar ratio (ratio in bold in Table 5), the amounts of albumin and PEG released were about 7.4% and 27.2% for the microparticles synthesized with 3.4 kDa PEG and 5.7% and 26.7% when 8 kDa PEG was used, respectively.

### **Surface charge**

The surface charge of the microparticles or Zeta potential was determined by electrophoresis. As shown in Table 6, the hydrogel microparticles were negatively charged as expected considering that a reaction takes place between the carbonate group of PEG and the free amino group of the protein. The negative Zeta potential of the microparticles ranged from -3 to -8 mV, and increased with the increase of the pH value. The composition, albumin type and PEG M.W., did not influence the Zeta potential of the particles. PEG is a neutral material, whereas albumin was mostly negatively charged in the specific pH range (neutral or basic).

### **Stability of the hydrogel microparticles**

The storage stability of the hydrogel microparticles was evaluated by comparing the microparticles' size and span values for a same batch at different storage periods (Table 7). The results indicate that after storage at 4°C for 4 to 13 months, no change in particle size and dispersibility was observed. The hydrogel microparticles were stable at least for 13 months of storage in PBS buffer at 4°C containing 0.01% azide.

### **CONCLUSIONS**

A new type of microparticles with high water content were synthesized by covalent crosslinking of albumin with activated PEG. The water content of these microparticles was influenced by the molecular weight of the PEG, the type of albumin and the molar ratio of the activated carbonate groups of PEG and the accessible amino groups of albumin. An increase in the relative amount of PEG produced microparticles with a higher water content. The presence of carbohydrate chains on the protein (ovalbumin and pea albumin) resulted in an increase in the water content and in the particle size. The M.W. of PEG was also determinant on the microparticles' size. The hydrogel microparticles were negatively charged. The hydrogel microparticles showed a good storage stability. Due to the good stability and range of size of this new type of microparticle, biomedical applications are considered such as controlled drug delivery.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank Dr R. Thibert (Merck Frosst Canada) for his valuable assistance with the measurement of the size of the hydrogel microparticles and Dr R.H. Marchessault (McGill University) for his help in the measurement of Zeta potential.

## REFERENCES

- 1- S.S. Davis, *Trends Biotechnol.* **15**, 217 (1997).
- 2- S.S. Davis and L. Illum, *Biomaterials* **9**,111 (1988).
- 3- R. Arshady, *Biomaterials* **14**, 5 (1993).
- 4- B.R. Conway, J.E. Eyles and H.O. Alpar, *J. Control. Release* **49**, 1 (1997).
- 5- R. Ghaderi and J. Carfors, *Pharm. Res.* **14**, 1556 (1997).
- 6- Y. Tabata, S. Gutta and R. Langer, *Pharm. Res.* **10**, 487 (1993).
- 7- M.Y. Arica, N.G. Alaeddinoglu and V. Hasirci, *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 152 (1998).
- 8- L. Brannon-Peppas, *Int. J. Pharm.* **116**, 1 (1995).
- 9- H. Okada, and H. Toguchi, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **12**, 1 (1995).
- 10- J.L. Cleland, *Pharm. Biotechnol.* **10**, 1 (1997).
- 11- T. Uchida, A. Yagi, Y. Oda, Y. Nakada and S. Goto, *Chem. Pharm. Bul.* **44**, 235 (1996).
- 12- L. Chen, R.N. Apte and S. Cohen, *J. Control. Release* **43**, 261 (1997).
- 13- H. Park and K. Park, (1996) in: *Hydrogels and biodegradable polymers for bioapplications*, R.M. Ottenbrite, S.J. Huang and K. Park, (Eds). ACS,Symposium Series No. 627, p.2.
- 14- E. D'Urso and G. Fortier, *J. Bioact. Compat. Poly.* **9**, 367 (1994).
- 15- E. D'Urso and G. Fortier, *Biotech. Tech.* **8**, 71 (1994).
- 16- J.-Ch. Gayet, P. He and G. Fortier, *Bioact. Compat. Poly.* **13**, 179 (1998).
- 17- E.M. D'Urso, J. J-François and G. Fortier, in: *Hydrogels and biodegradable polymers for bioapplications*. R.M. Ottenbrite, S.J. Huang, and K. Park, (Eds). ACS,Symposium Series No. 627, p.25 (1996).
- 18- J. Jean-François and G. Fortier, *Appl. Biochem.* **23**, 221 (1996).
- 19- J.-C Gayet and G. Fortier, *J. Control. Release* **38**, 177 (1996).
- 20- G.E.C. Sims and T.J. Snape, *Anal. Biochem.* **107**, 60 (1980).
- 21- R.E. Brown, K.L. Jarvis and K.J. Hyland, *Anal. Biochem.* **180**, 136 (1989).
- 22- F. Edwards-Lévy, M.-C. Andry and M.-C. Lévy, *Int. J. Pharm.* **96**, 85 (1993).
- 23- U. Sinha and J.M. Brewer, *Anal. Biochem.* **151**, 327 (1985).



- 24- N. B. Graham, M. Zulfiqar, N. E. Nwachuku and A. Rashid, *Polymer* **30**, 528 (1989).
- 25- R. Arshady, *J. Control. Release*, **14**, 111 (1990).

## CAPTIONS

### Figure 1

Optical micrograph of PEG-albumin hydrogel microparticles.

### Figure 2

Size distributions of the PEG-albumin hydrogel a) 3 $\mu$ m microparticles, b) 10 $\mu$ m microparticles, and c) 14  $\mu$ m microparticles.

### Figure 3

Viscosity of PEG solutions of various molecular masses at the concentrations used to prepare microparticles.

**Table 1**

Physicochemical characteristics of hydrogel microparticles synthesized at 2000 rpm using PEG of various M.W. at optimal molar ratios of BSA and PEG.

Protein	PEG (kDa)	EWC (%)	Solid Part (%)	Dispersibility*	Size (μm)	Span
BSA	20	98.3	1.7	±	50.51	1.32
BSA	10	96.5	3.5	+	37.69	1.18
BSA	8	96.9	3.1	+	25.14	1.33
BSA	4.6	95.6	4.4	+	19.58	1.09
BSA	3.4	94.8	5.2	+	13.72	0.62
BSA	2	94.4	5.6	+	10.04	0.71
BSA	1.45	94.3	5.7	± **	16.60	2.53

\* Quality of the dispersibility of hydrogel microparticles: +: good, ±:poor.

\*\* Aggregation of the microparticles.

**Table 2**

Physicochemical characteristics of hydrogel microparticles synthesized at 2000 rpm with various types of albumin.

Albumin	Protein M.W. (kDa)	PEG M.W. (kDa)	EWC (%)	Solid Part (%)	Dispersibility	Size ( $\mu\text{m}$ )	Span
Bovine	67	3.4	94.8	5.2	+	16.83	1.04
Rat	67	3.4	94.5	5.5	+	17.16	0.86
Pea	25	3.4	97.7	2.3	+	33.83	1.11
Egg	45	3.4	96.1	3.9	$\pm^*$	16.42	1.74

\*Aggregation of the microparticles

**Table 3**

Effect of the oil type on the characteristics of the hydrogel microspheres synthesized at 2000 rpm.

Oil type	Sphericity	Dispersibility	Size* ( $\mu\text{m}$ )
Cottonseed	Good	Good	15
Vegetable	No	Poor	30-50
Corn	No	Poor	-**
Mineral	No	Poor	-**

\*Size measurements were made with an optical microscope.

\*\*Aggregation of the microparticles.

**Table 4**

The physicochemical characteristics of hydrogel microparticles prepared at various stirring rates using optimal ratios of reagents.

Protein	PEG M.W. (kDa)	Stirring speed (rpm)	Dispersibility	Size ( $\mu\text{m}$ )	Span
BSA	3.4	1400	+	24.61	1.05
BSA	3.4	1700	+	19.41	1.05
BSA	3.4	2000	+	13.72	0.62
BSA	2.0	2000	+	10.04	0.71
BSA	3.4	2800	+	8.78	0.62
BSA	3.4	4000	+	5.20	1.17
BSA	2.0	4000	+	3.34	0.56
BSA <sup>*</sup>	2.0	4000	+	2.75	0.56
RSA <sup>*</sup>	2.0	4000	+	2.52	0.35

\* These microparticles were filtered on a polycarbonate 5 $\mu\text{m}$  pore membrane filter before measurement.

**Table 5**

Characteristics of hydrogel microparticles synthesized with PEG of various M.W. at different molar ratio (HO:NH<sub>2</sub>) at 2000 rpm and evaluation of the amounts of proteins and PEGs released during the washing of macroparticles.

**5a : Microparticles synthesized with PEG of M.W. 3.4 kDa.**

Ratio HO/NH <sub>2</sub>	Free NH <sub>2</sub> (%)	Dispersibility	EWC (%)	Size ( $\mu$ m)	%BSA release	%PEG release
4.5:1	23.5	±	95.8	29.08	5.9	34.4
<b>3:1</b>	<b>27.9</b>	+	<b>94.8</b>	<b>16.83</b>	<b>7.4</b>	<b>27.2</b>
2:1	58.0	+	96.0	29.07	6.5	31.7
1.5:1	70.0	±	95.2	43.13	4.7	22.0

**5b : Microparticles synthesized with PEG of M.W. 8.0 kDa.**

Ratio HO/NH <sub>2</sub>	Free NH <sub>2</sub> (%)	Dispersibility	EWC (%)	Size ( $\mu$ m)	% BSA release	%PEG release
2:1	47.4	+	97.1	24.55	5.1	30.8
<b>1.4:1</b>	<b>69.5</b>	+	<b>96.9</b>	<b>25.14</b>	<b>5.7</b>	<b>26.7</b>
1:1	79.1	+	96.0	36.65	3.8	23.6
0.7:1	85.2	+	95.7	45.39	6.2	20.5

Ratio lines in bold type are the optimal ratio

**Table 6**

Zeta potential of PEG-Albumin microparticles synthesized at a stirring speed of 2000rpm.

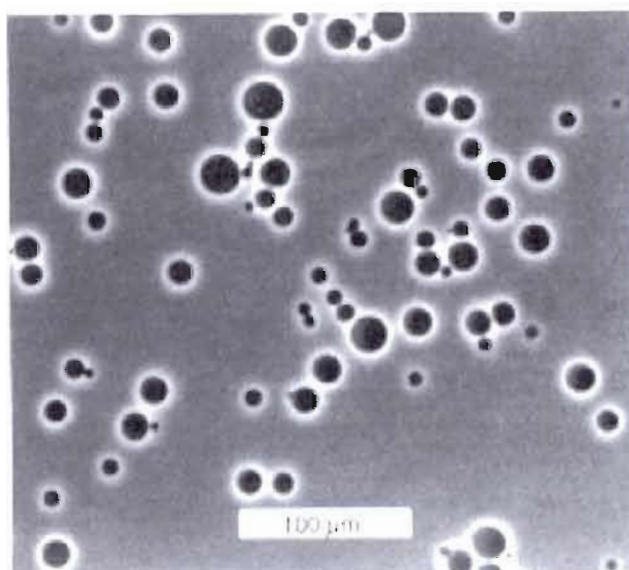
PEG M.W. (kDa)	Albumin	Zeta potential (mV)		
		pH 4.0	pH 7.0	pH 8.0
2.0	Bovine albumin	$-4.33 \pm 1.32$	$-5.60 \pm 0.78$	$-8.07 \pm 1.00$
2.0	Pea albumin	$-4.80 \pm 0.53$	$-7.26 \pm 0.99$	$-8.19 \pm 0.82$
2.0	Ovalbumin	$-3.16 \pm 0.33$	$-5.70 \pm 1.40$	$-6.55 \pm 1.04$
2.0	Rat albumin	$-4.56 \pm 0.61$	$-6.56 \pm 2.32$	$-6.78 \pm 1.38$
4.6	Bovine albumin		$-4.45 \pm 0.12$	

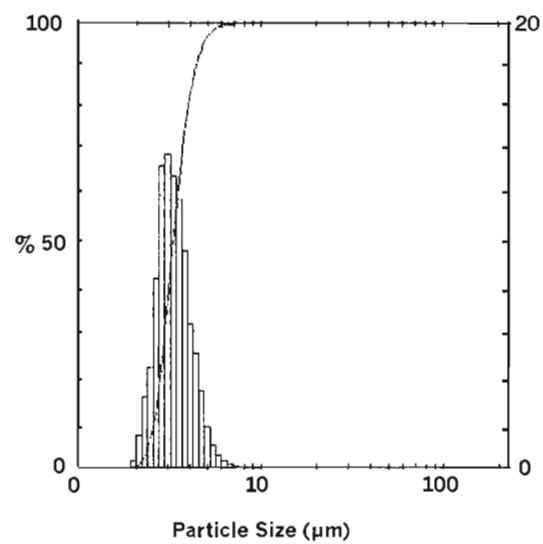


**Table 7**

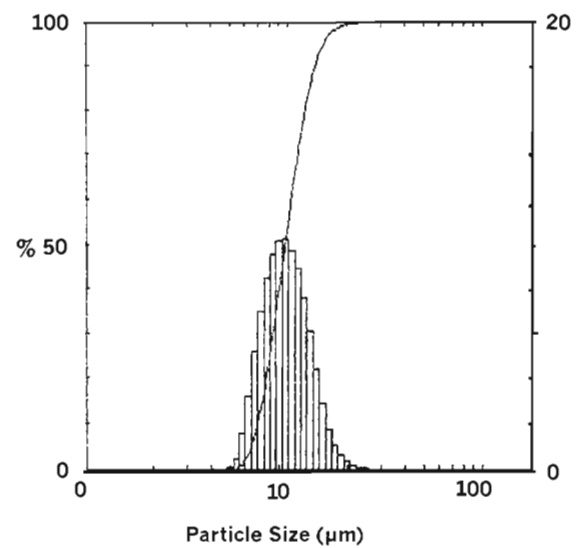
Storage stability at 4 °C of albumin-PEG microparticles prepared under different conditions.

Albumin	PEG M.W. (kDa)	Stirring speed (rpm)	Storage time (Months)	Size ( $\mu\text{m}$ )	Span
Bovine albumin	3.4	2000	1	13.39	0.96
	3.4	2000	10	13.50	0.88
Bovine albumin	2.0	2000	2.5	10.04	0.71
	2.0	2000	5.5	9.79	0.69
Bovine albumin	2.0	4000	1	2.67	0.32
	2.0	4000	3	2.71	0.35
Rat albumin	2.0	4000	0.5	2.75	0.56
	2.0	4000	2	2.82	0.52

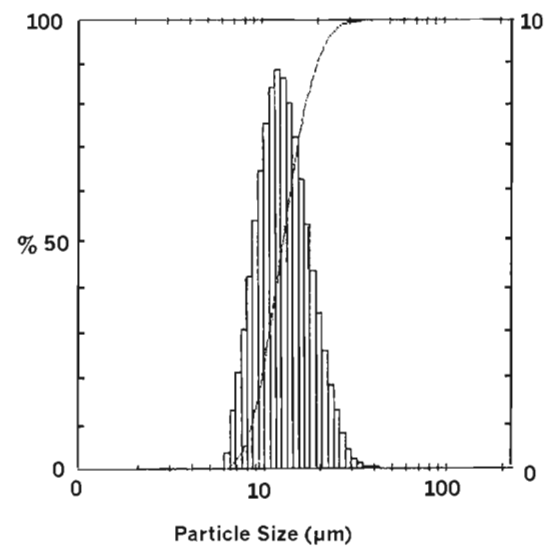




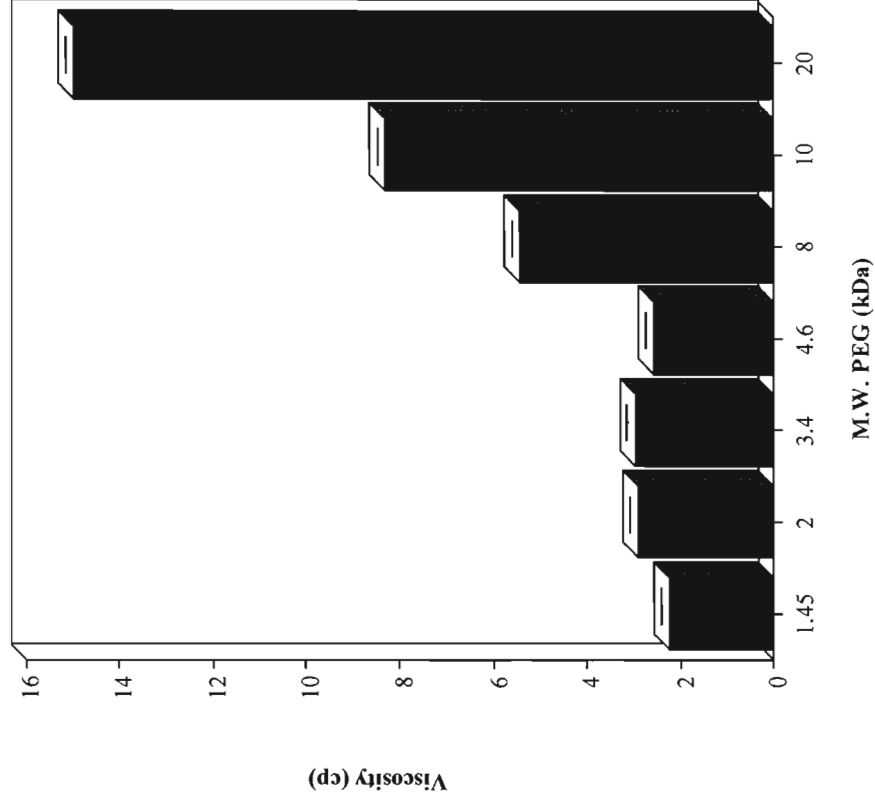
**a**



**b**



**c**



# **Microparticules d'hydrogel de PEG-albumine: Influence de la taille et de la nature de la surface sur leur biodistribution et leur élimination chez le rat.**

J. Jean-François, Y. Liu and G. Fortier\*

Laboratoire d'enzymologie appliquée

Département de chimie-biochimie, Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montréal (Québec) Canada H3C3P8

L'encapsulation de macromolécules dans des microparticules à des fins thérapeutiques s'est toujours heurtée à la rapide élimination de ces particules de la circulation sanguine. Le système réticulo-endothélial composé principalement du poumon et de la rate est le principal responsable de la séquestration des microparticules après leur injection en intraveineuse. Généralement, la biodistribution de microparticules dépend de deux facteurs importants: leur taille et la nature de leur surface. Cette étude démontre l'influence de ces deux paramètres sur la biodistribution de microparticules radioactives de PEG-albumine chez le rat. Les résultats montrent que suite à une injection intraveineuse de microparticules radioactives de PEG-albumine de 10 $\mu$ m, jusqu'à 90% des particules injectées sont retenues dans le poumon contre 10% qui se retrouvent au foie. Au contraire, 80% des particules de 3 $\mu$ m sont séquestrées par le foie et seulement 10% sont localisées dans le poumon. La surface des microparticules natives de 3 $\mu$ m avec un potentiel zêta de -19mV a été modifiée chimiquement pour générer des particules à surface aminée, PEGylée et lipidique avec des potentiels zêta respectifs de -11, -18 et -14 mV. Les études de biodistribution des microparticules natives et modifiées de 3 $\mu$ m ne montrent pas des différences très significatives. Toutes les préparations de microparticules de 3 $\mu$ m, natives ou modifiées, possèdent des temps de demi-vie élevés dans la circulation sanguine allant de 6.43 à 8.65h, la valeur la plus élevée étant observée pour les particules PEGylées. Ce phénomène serait dû à la présence de Triton lors de la préparation de ces microparticules. En l'absence de Triton, les particules possèdent une très courte demi-vie plasmatique.

## **Hydrogel microparticles of PEG-albumin: Influence of size and surface nature on their biodistribution and elimination in the rat.**

J. Jean-François, Y. Liu and G. Fortier\*

Laboratoire d'enzymologie appliquée  
Département de chimie-biochimie, Université du Québec à Montréal  
C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montréal (Québec) Canada H3C3P8

**Keyword :** Microparticle, hydrogel, albumin, poly(ethylene glycol), biodistribution, surface modification, zeta potential, elimination half-life.

**Short running title:** Biodistribution of PEG-RSA microparticles in rats.

\* to whom correspondence should be sent

Dr G. Fortier  
Laboratoire Enzymologie Appliquée  
Université du Québec à Montréal  
C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal (Québec),  
Canada H3C3P8  
Tel : 514-987-3000 ext. 4455  
Fax: 514-987-4054  
fortier.guy@uqam.ca

**ABSTRACT**

The use of microparticles loaded with macromolecules for therapeutic purposes has been hampered by their quick removal from the blood by the reticuloendothelial system (liver, spleen) following intravenous injection. Microparticle biodistribution is governed mainly by two important parameters: their size and the nature of their surface. This work studied the influence of these two parameters on the biodistribution of radioactive albumin-PEG microparticles in rats. Our results showed that after intravenous injection of 10 $\mu$ m albumin-PEG microparticles, up to 90% of these particles were trapped in the lung and less than 10% in the liver while for 3 $\mu$ m microparticles 10% were found in the lung and 80% in the liver. The surface of the 3 $\mu$ m native particles with a zeta potential of -19mV was chemically modified to obtain aminated, PEGylated and lipidated microparticles with respective zeta potentials of -11, -18 and -14mV. Biodistribution studies of native and modified 3 $\mu$ m microparticles showed no significant differences. All 3 $\mu$ m microparticles, native or modified, showed very high half-lives in blood ranging from 6.43 to 8.65h with the highest value shown by the PEGylated microparticles. This phenomenon might be attributed to the presence of Triton X-100 in the medium preparation since microparticles prepared in absence of Triton showed very short residence time in the blood.

## INTRODUCTION

Since the pioneer work of Folkman and Langer in 1976 which showed the usefulness of polymers as carriers for therapeutic molecules [1], fast progress has been made in the field of controlled delivery of peptides and proteins. The intravenous administration of peptide or protein solutions has some problems such as short residence time in blood, rapid inactivation by opsonins and proteases and possible immunogenicity. The use of colloidal systems (implants, micro- or nanoparticles) allows one to circumvent these disadvantages. Loading a macromolecule into a colloidal carrier alters its pharmacokinetics, which are then governed by the physico-chemical characteristics of the carrier [2]. Colloidal carrier parameters such as size, hydrophilicity/hydrophobicity polymer ratio, surface charge and type of polymer dictate the biodistribution of the formulation *in vivo*. Such flexibility explains the rapid growth of research on micro- and nanoparticles along with others vectors such as liposomes and solid lipid particles. Many examples were published on the use of carriers for controlled delivery of insulin [3-5], calcitonin [6-8], IL-1 (interleukin-1)[9], IL-12 (interleukin-12) [10], NGF (nerve growth factor) [11], or antigens [12].

The fate of intravenously administered micro-, nanoparticles is influenced by two important parameters: the size and the surface characteristics of the carriers. Microparticles having a diameter greater than 5 $\mu$ m are mainly trapped in the capillary bed of the lung and cannot go further [13]; while smaller micro-, nanoparticles can reach the liver where they are quickly removed from the blood circulation, whatever their composition. This rapid clearance of the particles from the blood results from phagocytosis by macrophages located in the reticuloendothelial system (RES) [14]. These



cells have receptors for opsonins which are blood proteins mediating the interactions between macrophages and particulate materials recognized as non-self. It has been shown that phagocytosis is increased in the presence of micro-, nanoparticles with hydrophobic surfaces [15-16] and decreased in the presence of particles of neutral surface charge, based on Zêta potential [16-17]. The best RES-avoiding strategy is to use a carrier which has a high hydrophilicity and a neutral surface charge. This can be obtained by chemical grafting of a hydrophilic and flexible polymer such as poly(ethylene glycol) [PEG] or poly(ethylene oxide) [PEO] at the surface of the carrier [18-20] or by adsorption of a hydrophilic surfactant such as Poloxamer 338 or Poloxamine 908 at the particles' surface [21-22]. Polymer/surfactant coated micro- or nanoparticles show longer circulation time and delayed phagocytosis and an altered biodistribution when injected intravenously compared to non-coated particles. Instead of accumulating in the liver, coated particles demonstrated an increased uptake in other body sites (spleen, bone marrow) [23].

As recently published [24], we have modified chemically the surface charge (net negative or positive surface) and composition (hydrophilic or hydrophobic) of microparticles obtained by a water in oil emulsion of an aqueous reagent mixture containing bovine serum albumin [BSA] and p-dinitrophenyl carbonate PEG. Herein, the data about the clearance and the biodistribution of these various modified microparticles following intravenous injection in rats will be presented. Thorough evaluation of hydrogel microparticles' behaviour *in vivo* will allow to design optimal and the formulations for controlled delivery of proteins *in vivo*.

## MATERIALS AND METHODS

### MATERIALS

Rat serum albumin (RSA), bovine serum albumin (BSA), protease from *S. griseus* (5.6U/mg), polyethylene glycol of molecular weight (M.W.) 2kDa, methoxypolyethylene glycol of molecular weight 5kDa, cottonseed oil, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC), chloramine T and sodium metabisulfite were all purchased from Sigma (St Louis, USA). Triton X-100 was purchased from Fluka MG (Germany). Na<sup>125</sup>I (100mCi/ml) was purchased from ICN (Costa Mesa, USA). Ethylene diamine (EDA), 4-nitrophenyl chloroformate, triethyl amine and palmitoyl chloride were purchased from Aldrich (St Louis, Mo, USA). Male Sprague-Dawley rats (200-250g) were obtained from Charles Rivers (St-Constant, Canada).

### METHODS

#### Activation of PEG

The activation of polyethylene glycol of (M.W.) 2kDa or methoxypoly(ethylene glycol) (mPEG) of M.W. 5kDa was performed with 4-nitrophenyl chloroformate according to a published procedure [25]. The resulting di-p-nitrophenylcarbonate PEG and p-nitrophenyl carbonate m-PEG were stored at -20°C.

#### Synthesis of microparticles

Microparticle synthesis was carried out in a thermostated beaker containing 240ml of cottonseed oil under stirring provided by a Cole-Parmer® Servodyne electronic mixer as described before [26]. A volume of 500µl containing 1 part of 100mg/ml albumin

(RSA or BSA) in 400mM borate buffer pH 9.4 and 1 part of activated bifunctional PEG 2K at 270mg/ml in water were injected in bolus into the stirred oil . The initial speed of the propeller was 4000rpm and 2000rpm for 3 $\mu$ m and 10 $\mu$ m microparticles respectively. The initial temperature was 25°C and 4°C for 3 $\mu$ m and 10 $\mu$ m microparticles respectively and the final temperature was 25°C for both microparticles. The speed of the propeller was gradually decreased to 1500 rpm during a 6 hour period and a 4 hour period for 3 $\mu$ m and 10 $\mu$ m microparticles respectively, then the reaction was stopped. Fifty ml of pentane were added to the mixture and the solution was centrifuged at 10,000 rpm in a IEC B-204 centrifuge. The sedimented microparticles were washed 3 times in Phosphate Buffered Saline (PBS) (137mM NaCl, 5mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH 7.4 and stored at 4°C until further use.

## **Microparticles' characterization**

### *Size measurement*

Size measurements of hydrogel microparticles were performed on a Malvern 2600 Series particle size analyzer by light diffraction. The light source was provided by a helium-neon laser. Briefly, a volume of microparticles was diluted in a cuvette containing 25ml of PBS to obtain, before measurement, an obscuration of 0.021%. The sample was then measured and particle mean diameter and span were calculated by the operating system (SB.OB). The span which evaluated the width of the volume distribution relative to the median diameter was defined as:

$$\text{Span} = (D_{90\%} - D_{10\%}) / D_{50\%} \quad D_{x\%} \text{ is the diameter at } \% \text{ point.}$$

### *Zeta potential measurements*

Zeta potential of hydrogel microparticles was measured using Zeta Plus, a zeta potential analyzer working with a solid state laser (red, 676nm wavelength) (Brookhaven Instruments, New York, USA). Samples were prepared in 1mM KCl solution and transferred in a specially designed polystyrene cuvette (Brookhaven Instruments, New York, USA) in which an electrode was inserted. Before measurements, the conductance was adjusted to a value of  $320\mu\text{S} \pm 10\%$ . Measurements were then performed and the zeta potential data were obtained from an average of 10 runs.

### **Post-synthesis modification of microparticles**

#### *Surface amination of the microparticles*

Surface amination was carried out as described before [24]. An amount of 1.0g of hydrated microparticles was suspended in 1.2 ml of pH 7.4 PBS containing 0.1% Triton X-100. The initial pH was decreased to 3.5 using 5.0N HCl and that was followed by the addition of EDAC at a 8:1 molar ratio with respect to the carboxyl groups of microparticles. After 5 min of incubation at room temperature, the reaction was stopped by increasing the pH to 10 using NaOH 5.0 N. Then, 0.3 ml of TEA was added along with ethylenediamine at a molar ratio of 4:1 based on the carboxyl groups of microparticles. The reaction was carried out at room temperature for 2 h and stopped by adding 25ml of 50 mM phosphate buffer, pH 5.0. Microparticles were collected by centrifugation at 16,000 rpm in a IEC B-204 centrifuge. After centrifugation, microparticles were washed five times in 12.5mM borate buffer, pH 8.5. The

microparticles were stored in borate buffer pH 8.5, 12.5mM containing 0.02%  $\text{NaN}_3$  at 4°C.

#### *Surface PEGylation of the microparticles*

Surface PEGylation was carried out as described before [24]. One gram of aminated microparticles was suspended in 3.5 ml of 100 mM borate buffer, pH 9.4, and activated mPEG<sub>5,000</sub> was added at a molar ratio of 4:1 to the total amino groups of aminated microparticles. After a 3 h reaction at room temperature, microparticles were washed with borate buffer several times until all *p*-nitrophenol was eliminated.

#### *Surface lipidation of microparticles*

Surface lipidation was carried out as described before [24]. One gram of aminated microparticles was suspended in a mixture containing 2.7 ml of 1,4-dioxane and 0.3 ml of TEA. Then 30  $\mu\text{l}$  of palmitoyl chloride was added and the reaction was carried out at room temperature for 3 h. Microparticles were recovered by centrifugation at 16000rpm in a IEC B-204 centrifuge and washed twice with 1,4-dioxane to eliminate free palmitic acid and then washed thoroughly with borate buffer.

#### **Primary amino group measurement**

The degree of modification of the microparticle surface was measured by the TNBS assay [27]. Two hundred mg of microparticles were suspended in 0.4 ml of 12.5 mM borate buffer, pH 8, and 25  $\mu\text{l}$  of 30 mM TNBS aqueous solution was added. After incubation at room temperature for 1 h, microparticles were washed and hydrolyzed in

the presence of 0.02% (w/v) pronase solution for 30 min at 37°C. The absorbance of the hydrolysate was evaluated at 405 nm and the free amino groups were quantified using standard curves of glycine-TNBS.

### **Radioactive microparticle preparations**

To 2-3g of hydrated native or surface modified microparticles suspended in 5ml of PBS containing 0.1% Triton X-100, pH 7.4 were added 2 $\mu$ l of Na<sup>125</sup>I (200 $\mu$ Ci) followed by 0.5ml of chloramine T (3.6mg/ml) and mixed gently for 2 minutes. The reaction was stopped by adding 0.5ml of sodium metabisulfite (10mg/ml) under gentle stirring for 2 minutes. The radioactive microparticles were transferred in a dialysis bag (M.W. cut off 12000-14000) and dialyzed overnight against PBS, pH 7.4 to eliminate unbound reagents. The washing medium was changed three times. Prior to injection in a rat, the suspension of microparticles was filtered on a polycarbonate filter with 5 $\mu$ m size pore to avoid aggregation (AMD, Mississauga, Canada).

### **Biodistribution and pharmacokinetics of native and modified microparticles**

Anesthetized male Sprague-Dawley rats (200-250g) were injected in the caudal vein with 100-200 $\mu$ l (5-11 $\mu$ Ci/kg) of radioactive microparticles prepsuspended in sterile PBS, pH 7.4. Blood samples (40 $\mu$ l) were obtained in heparinized capillary glass tubes from a small incision at the end of the animal tail at various times (2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300 minutes). Five hours after injection, animals were euthanasized by a mixture of O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> and their lungs, liver, spleen, kidneys and heart were isolated to evaluate their radioactivity content. Each organ was cut to small pieces with scissors and

put in a test tube. Radioactivity in blood and organs were read directly on a 1282 Compu Gamma CS gamma counter (Pharmacia, Finland).

The choice of a pharmacokinetic model is validated by finding the equation which describes the best curve fitting the experimental data. Using non-linear regression (Kaleidagraph), blood clearance data of the injected radioactive microparticles were fitted to a double exponential curve with the following equation:

$$Q = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

This equation describes in pharmacokinetics a two-compartment or bicompartiment model. The injected microparticles behaved as though they were contained in two separate compartments: the central compartment (blood) and the peripheral compartment (tissues). In such a model, the microparticles once injected will undergo two phases. A distribution phase (or phase  $\alpha$ ) during which they are transported in the various compartments and an elimination phase (or phase  $\beta$ ) during which they are removed from the blood by the reticuloendothelial system. The distribution half-life,  $T_{1/2\alpha}$ , was determined by the method of residuals and  $T_{1/2\beta}$  was determined from the linear regression of the elimination phase straight line. These two half-lives were used to calculate other pharmacokinetic parameters such as  $K_{1\rightarrow 2}$  (transport rate constant from central compartment to peripheral compartment),  $K_{2\rightarrow 1}$  (transport rate constant from peripheral compartment to central compartment),  $K_e$  (elimination rate constant from central compartment) and AUC (area under the plasma concentration curve).

To study the influence of multiple injections on the microparticle blood clearance, the rats were injected three times in the caudal vein with 100-200 $\mu$ l of radioactive

microparticles in sterile PBS, pH 7.4. The first injection was administered at time 0 and blood was sampled as described above at 2, 5, 10, 15 and 20 minutes. The second injection was performed 30 minutes after the first one and blood was sampled at 32, 35, 40, 45 and 50 minutes. The last injection was administered at 70 minutes and blood was sampled at 72, 75, 80, 85, 90, 100, 130, 190 and 250 minutes. At the end, rats were euthanized and the same procedure as described above was followed to measure radioactivity in the blood and in the organs.

### **Statistical analysis**

For statistical analysis, the clearance curves of the various preparations of microparticles were compared one to another by the incremental parameters method. Statistical analysis of the biodistribution in the five organs was performed by variance analysis (ANOVA) with the Tukey-Kramer adjustment for multiple comparisons.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Size and zeta potential evaluation of the various microparticle preparations**

Polymer particles prepared by conventional emulsion polymerization methods such as homogenizer and/or supersonic apparatus produce highly polydispersed microparticles [28]. Muramatsu and Kondo successfully synthesized monodispersed albumin microparticles using a microporous glass membrane with different pore sizes [29]. We have shown using a homogenizer that monodispersed hydrogel microspheres of PEG-albumin can be prepared [26]. PEG-albumin microparticles with different sizes (Table 1) can be synthesized by simply varying the speed of the propeller. As an example using



bovine albumin and PEG of MW 2000Da, BSA-PEG microparticles of  $10.4 \pm 0.2\mu\text{m}$  of diameter with a span of  $1.4 \pm 0.1$  were obtained when the rotation of the propeller was set at 2000rpm (Table 1). Using the same mixture preparation at a propeller speed of 4000rpm, microparticles of diameter  $3.26\mu\text{m}$  and  $3.66\mu\text{m}$  and the spans of 0.54 and 0.66 were synthesized for rat albumin and bovine albumin, respectively (Table 1). These microparticles showed also low polydispersity (Figure 1) which is ideal for therapeutic application requiring microparticles with a precise size.

As described previously [21], the net charge at the surface of the microparticle is an important parameter in influencing the *in vivo* distribution. As the cross-linking reaction between BSA and activated PEG results in urethane bonds between the free amine groups brought by BSA and the carbonate groups of PEG, it is expected that the charge of the microparticle at pH 7.0 will be negative. Also, the isoelectric point of BSA is around 5.6 and at this pH all of the carboxylic groups brought by the protein are ionized. The zeta potential was evaluated for the various preparations and the values are reported in Table 1. As expected, the native microparticles showed the highest negative zeta potential ( $-19\text{mV}$  for  $3\mu\text{m}$  microparticles) while the aminated microparticles showed the less negative zeta potential ( $-11\text{mV}$ ). Activating native microparticles with EDAC and allowing a reaction between activated carboxylic groups and ethylenediamine results in the neutralization of many  $\text{COO}^-$  groups and to the addition of amine free groups bearing less positive charges at pH 7.0. The net effect of this modification is a decrease in the negative charge from  $-19.50\text{mV}$  to  $-11.61\text{mV}$  when compared with the native microparticles. PEG-modified and lipid-modified microparticles are obtained by grafting PEG or lipids on the new amine groups. The zeta potentials for PEGylated- and lipidated-

microparticles were lower than the zeta potentials of native microparticles because all amino groups had not reacted and there are also less free carboxylic groups. It is a well established fact that the presence of PEG chains on the surface of micro-, nanoparticles decreases the zeta potential by shielding the surface charge. The PEG layer shifts the shear plane of the diffuse layer to a larger distance from the particles and this results in a decrease of the measured absolute value of the zeta potential [14, 30-32]

### **Effect of the size of the native microparticle on its final biodistribution in rats**

As shown in Figure 2, when radioactive microparticles of 10 $\mu$ m in diameter were injected intravenously in the rats, they accumulated mainly in the lung (up to 90%) due to mechanical filtration made by the lung capillary bed [13,14]. Less than 10% of the microparticles reached the liver. These particles in the liver probably account for the smaller microparticles present in the sample. The amount of radioactivity retrieved in the spleen represents less than 5%. The amount of radioactivity retrieved in the kidney and the heart was negligible. No radioactivity was detected in the blood at the end of experiments.

When microparticles of 3 $\mu$ m in diameter either made of RSA or BSA were injected intravenously, different distribution patterns were observed from that for microparticles of 10 $\mu$ m in diameter. The majority of the radioactivity, up to 80%, was detected in the liver and 10% in the spleen. Only 10% of the total radioactivity was retrieved in all other organs, mainly in the lung. Radioactivity retrieved in the lung may be attributed to aggregation of some microparticles. Most of the microparticles, because of their small size, were able to proceed to the liver where they were withdrawn from the circulation by

Kupffer cells. Only a small fraction escaped and reached the spleen. There was no significant increase in the amount of radioactivity in the heart and the kidney when compared to the 10 $\mu$ m microparticles. The results were similar for both types of albumin used.

### **Blood clearance of native microparticles**

The blood clearance of RSA-PEG and BSA-PEG 3 $\mu$ m microparticles injected intravenously (Figure 3) was very rapid. Effectively, 2 minutes after injection, less than 5 % of the injected radioactive dose was still detected in the blood. The clearance observed herein was faster than that observed with an intravenous dose of 3 $\mu$ m labeled BSA microspheres [33]. In the later study, 20% of the labeled microparticles remained in the blood 3 minutes after they were administered to rats [33]. One hour after injection, a slight increase of radioactivity in the blood (2-3% of the injected dose) was observed herein, which might be attributed to the break down of aggregated microparticles trapped in the lung.

When 3.75 $\mu$ m microparticles were incubated with Triton X-100 and then injected in rats, a dramatic change occurred in microparticle clearance. Effectively, after 5 min following the injection, 30% of the dose was detected in the blood and even, more than 10% of the injected dose was still circulating in the blood 3 hours after the beginning of the experimentation. This may be explained by the fact that these microparticles were prepared in the presence of Triton X-100, a non-ionic surfactant. Araujo et al. reported an increased blood circulation time of 2-<sup>14</sup>C-poly(methyl methacrylate) nanoparticles coated with Poloxamine 908 at a concentration of 0.1% when compared to the uncoated particles

[34]. Similar to Poloxamine-908, Triton X-100 (p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl polyethyleneglycol) is a non-ionic surfactant and has an amphiphilic structure made with a hydrophobic head (p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl) and a hydrophilic tail (short polyethylene glycol chain). Binding studies have shown that BSA, at pH 7.0, can bind up to 15 molecules of Triton [35]. It was suggested that hydrophobic cavities close to the surface of BSA can accommodate the hydrophobic head group of Triton X-100 while the hydrophilic tail extends into the aqueous medium [35]. In the present study, BSA molecules were able to bind Triton X-100 showing that their crosslinking of with bifunctional PEG had no detrimental effect on their 3-D structure. Surface adsorption of Triton molecules leads to a significant increase in the thickness of the hydrophilic layer around the microparticle. The layer of Triton coat not desorb entirely as previously demonstrated with latex microspheres [36]. The most effective polymers to suppress recognition of particles by macrophages and to increase their blood circulation time are mainly composed of a polymeric chain containing at least 70 ethylene oxide (EO) units as was found with Poloxamine-908 and Poloxamer-407 [37]. Triton X-100 was effective with only 9 EO units. It should be mentioned that during the course of the experiment none of the animals, even rats injected with 10  $\mu\text{m}$  microparticles, have shown adverse effects related to the presence of microparticles in the lung.

### **Effect of multiple injections of native microparticles**

It is well known that the blood circulation half-life of microparticles depends on the extent to which they are cleared from the circulation by the macrophages of the RES. The clearance mechanism can be reduced by a prior injection of dextrane sulfate, a

phagocytosis depressant [38] or by administering a dose of microparticles to saturate the macrophages [39]. A group of rats was injected with a dose of 3 $\mu$ m labelled RSA-PEG microparticles prepared in the absence of Triton (Figure 4). As expected, the clearance was very fast, 95% of the injected microparticles disappeared from the blood in less than 3 min. Thirty min later, a second injection of a similar dose of the same microparticles was given. Twenty min after the second injection, more than 10% of the injected dose was still circulating in the blood. A third injection was performed 70 minutes after the first one. At 72 min, around 20% of the injected third dose was detected. With time, a cumulative effect of successive injections was observed, since 2 hours after the last injection, the radioactivity in the blood rose slowly to a maximum of about 25%. Moghimi and Gray, using 60nm long-circulating Poloxamine-908 coated nanoparticles, showed an accelerated blood clearance of a second dose of the coated particles when administered 3 days after the first dose. This effect was time-dependent and was not observed if the second dose was administered 1-2 days or 2 weeks after the first dose [40]. Multiple injections allowed saturation of the RES and maintained a fair amount of the microparticles in circulation. However, injecting a phagocytosis depressant or saturating the RES with a dummy doses of particles is not relevant from a clinical point of view, because of concern for the impairment of RES function. Other approaches including adjustment of the size (as discussed above), surface charge and surface hydrophobicity/hydrophilicity ratio to increase the circulation time of microparticle preparations are clinically more relevant [41].

### **Effect of surface chemistry of microparticles on their biodistribution and clearance**

Different groups of rats ( $n = 5$  to 12 rats) were injected intravenously with one of the various preparations of  $3\mu\text{m}$  surface modified BSA-PEG microparticles. To avoid aggregation, Triton X-100 at a concentration of 0.1% was used during the chemical surface modification of the microparticles. The biodistributions of the various preparations of  $3\mu\text{m}$  BSA-PEG microparticles (native, aminated, PEGylated and lipidated) prepared in the presence of surfactant are described in Figure 5 and showed significant differences. As an example, the amounts of aminated and PEGylated microparticles retrieved in the lung were 7 and 5% of the dose, respectively, and were significantly lower than the amounts of lipidated and native microparticles retrieved in the same organ which were 15% and 12% of the dose, respectively. This two-fold accumulation in the lung can be explained by the higher mean diameter which is  $4.27\mu\text{m}$  (Table I), a value close to the  $5\mu\text{m}$  cut-off required for a microparticle to circulate freely in the lung capillaries [13]. In comparison, the aminated and the PEGylated microparticles have smaller mean diameters of  $3.35\mu\text{m}$  and  $3.17\mu\text{m}$ , respectively (Table I). A significantly higher proportion of PEGylated microparticles, about 62%, was retrieved in the liver. This is an 8 and 16% higher proportion than that observed for lipidated and native microparticles, respectively. PEGylated microparticles are the smallest of the four preparations of microparticles in terms of mean diameter. However, the higher amount of PEGylated microparticles in the liver didn't mean that they were trapped permanently in the organ but that they were probably part of a pool of circulating microparticles which should be reflected in the longer blood circulation time.

Comparison of Figures 2 and 5 indicates that Triton has an influence on the biodistribution of 3 $\mu$ m microparticles as it was observed with 10 $\mu$ m particles. The uptake of the 3 $\mu$ m microparticles by the liver was reduced from 80% to 50% when Triton was used to prepare microparticles. The spleen uptake showed an opposite pattern with an increase from 10% to around 30% for microparticles prepared with Triton. A three-fold increase from 3% to 8% was observed in the kidney, a well irrigated organ. These results can reflect an increase in the blood residence time of the microparticles since they are similar to biodistribution studies done using nanoparticles coated with non-ionic surfactants like poloxamine-908 or poloxamer-437. An increase in the residence time in the blood and in the uptake by the spleen were observed along with a decreasing uptake in the liver [22, 23, 34, 37, 40].

Triton, when used in the preparation of various radioactive microparticles had a greater influence on blood residency time (clearance) (Figure 3) than on organ distribution (Figure 2). All of the clearance curves, irrespectively of surface chemistry and dose of the microparticle, showed a biphasic exponential pattern composed of an alpha phase (distribution phase) and a beta phase (elimination phase). Despite the fact that Triton was an important factor in the increase of the circulation time of the 3 $\mu$ m BSA-PEG microparticles, it cannot explain the differences observed in the clearance profiles of the various preparations. First of all, with the aim of eliminating a possible saturation of the RES by the microparticles, a series of rats was injected with a low dose of lipidated microparticles (0.59 $\mu$ Ci/kg) or with a high dose of lipidated microparticles (11 $\mu$ Ci/kg). Blood clearance curves obtained behaved similarly, and after five hours post injection, 25% of the low dose and 20% of the high dose were still present in the blood

(Figure 6). As the two doses of microparticles showed no significant difference in their elimination half-lives, 385 min versus 402 min (Data not shown), it can be concluded that at the dose level used for the experiment, saturation of the RES will not have to be taken into account for the differences observed in clearance.

When a series of rats was injected with a similar dose ( $5\mu\text{Ci/kg}$ ) of native or amine-modified microparticles, a marked difference in the blood clearance time was observed. At five hours post injection, more than 30% of the injected aminated microparticles were still present in the blood compared to only 10% for the native ones (Figure 7).

The half-life of the distribution phase ( $T_{1/2\alpha}$ ) is almost identical for all 4 microparticle preparations ranging from 8 to 15 minutes (Table 2) which suggests a non-specific mechanism. The elimination phase is the mechanism by which the macrophages of the RES, mainly from the liver, cleared the microparticles from the circulation. The beta or elimination phase involves specific interactions between the microparticles and the macrophages. The nature of the surface chemistry of the particles might explain the differences observed in the behaviors of the various microparticles. As already mentioned, increase in the hydrophilicity or decrease in the surface charge of the microparticles [16, 18, 21] are the favorite approaches to diminish the capture of the microparticles by the RES. Native microparticles which have the highest negative zeta potential are expected to be cleared faster than the amine-modified microparticles or PEGylated or lipidated microparticles with smaller negative zeta potential. Therefore the results in Figure 7 and Figure 8 are in accordance with previous published studies. PEGylated microparticles showed at 8.65h the highest elimination half-time (Table 2) despite having a higher zeta potential than the aminated microparticles. A low density of



PEG molecules at the microparticle's surface unable to mask the surface charge but enough to prevent efficient blood protein adsorption might explain this result. Surface modification [42], surface grafting of PEG [14, 18, 20, 23, 30] and surface adsorption of non-ionic surfactants [31, 41] are well known methods to shield the surface charge of particles which allows an increase in the circulation time of particles in blood. In this study similar conclusions can be drawn for the albumin-PEG hydrogel microparticles.

Besides surface charge, another factor governing the interactions of the microparticles with the macrophages is the nature of the microparticle's surface. Nanoparticles like PLGA nanoparticles were removed very quickly from the blood after an intravenous injection while coupling PEG to the nanoparticle surface can reduce this process [14]. The pegylated BSA-PEG microparticles showed the highest half-life for the elimination phase with 8.65 h and the lipidated microparticles have the lowest one at 7.03h, of the 3 preparations injected at 11 $\mu$ Ci/kg (Table 2). The presence of PEG at the microparticle's surface creates a steric barrier that decreases macrophage-microparticle interactions by preventing the adsorption of plasma proteins on the surface. This effect depends on the length of the PEG and its density on the microparticle's surface [18, 31]. It is noteworthy to point out that our microparticles despite their size (3 $\mu$ m), seem to behave like long-circulating nanoparticles. Li et al. in 2001 using PEG-polycyanoacrylate nanoparticles (153nm) [43], and Panagi et al. in 2001 using m-PEG-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles (113nm) [44], have found elimination half-lives ( $T_{1/2\beta}$ ) of 7.42 h and 7.83 h, respectively. The elimination half-lives of the different preparations of 3 $\mu$ m PEG-BSA microparticles ranged from 6.43 h (native) to 8.65 h (PEGylated) which is well inside the range found for stealth nanoparticles.

## CONCLUSIONS

This study shows that 3 $\mu$ m PEG-BSA hydrogel microparticles when prepared in the presence of Triton X-100 have a residence time in the blood similar to stealth nanoparticles. By modifying the surface chemistry, it is also possible to improve the blood circulation time of hydrogel microparticles. The presence of Triton X-100 is a key factor since absence of the surfactant during the preparation produced microparticles which are cleared quickly from the blood. Further studies are required to evaluate the impact of Triton X-100 on the biocompatibility of the various preparations of these hydrogel microparticles.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie, the Fonds de Formation et d'Aide à la Recherche and the Université du Québec à Montréal for their financial support. Our special thanks to Ms Sophie Ouellette for her help during the intravenous injections. We would like to thank Dr Roch Thibert (Merck Frosst Canada, Montreal) for giving us access to the Malvern 2600 for particle size measurement, Dr Benoît Marsan (UQAM) for allowing us the use of the Zeta Sizer for zeta potential measurement and Mr Bertrand Fournier (UQAM) for the statistical analysis.

## RÉFÉRENCES

- 1) Langer R. and Folkman J. (1976) Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* **263**, 797-800.
- 2) Allen T.M., Hansen C.B. and Lopes de Menezes D.E. (1995) Pharmacokinetics of long circulating liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **16**, 267-284.
- 3) Jerry N., Anitha Y., Sharma C.P. and Sony P. (2001) *In vivo* absorption studies of insulin from an oral delivery system. *Drug Deliv.* **8**, 19-23.
- 4) Musabayane C.T., Munjeri O., Bwititi P. and Osim E.E. (2000) Orally administered insulin loaded amidated pectin hydrogel beads sustain plasma concentrations of insulin in streptozotocin-diabetic rats. *J. Endocrinol.* **164**, 1-6.
- 5) Fernandez-Urrusuno R., Calvo P., Remunan-Lopez C., Vila-Jato J.L. and Alonso M.J. (1999) Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.* **16**, 1576-1581.
- 6) Morimoto K., Katsumata H., Yabuta T., Iwanaga K., Kokemi M., Tabata Y. and Ikada Y. (2000) Gelatin microspheres as a pulmonary delivery system: evaluation of salmon calcitonin. *J. Pharm. Pharmacol.* **52**, 611-617.
- 7) Kawashima Y., Yamamoto H., Takeuchi H. and Kono Y. (2000) Mucoadhesive DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres coated with chitosan to improve oral delivery of calcitonin. *Pharm. Dev. Technol.* **5**, 77-85.
- 8) Diaz R.V., Llabres M. and Evora C. (1999) One-month sustained release microspheres of 125-I-bovine calcitonin. *In vitro-in vivo* studies. *J. Control. Release* **59**, 55-62.
- 9) Mullerad J., Cohen S., Voronov E. and Apte R.N. (2000) Macrophage activation for the production of immunostimulatory cytokines by delivering IL-1 via biodegradable microspheres. *Cytokine* **12**, 1683-1690.
- 10) Egilmez N.K., Jong Y.S., Sabel M. S., Jacob J.S., Mathiowitz E. and Bankert R.B. (2000) *In situ* tumor vaccination with IL-12 encapsulated biodegradable microspheres: induction of tumor regression and potent antitumor immunity. *Cancer Res.* **60**, 3832-3837.
- 11) Pean J.M., Menei P., Morel O., Montero-Menei C.N. and Benoit J.P. (2000) Intraseptal implantation of NGF-releasing microspheres promote the survival of axotomized cholinergic neurons. *Biomaterials* **21**, 2097-2101.

- 12) Langer R., Cleland J.L. and Hanes J. (1997) New advances in microsphere-based single-dose vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **28**, 97-119.
- 13) Schroeder H.G., Simmons G.H. and DeLuca P. (1978) Distribution of radiolabeled subvisible microspheres after intravenous administration to beagle dogs. *J. Pharm. Sci.* **67**, 504-507.
- 14) Gref R., Domb A., Quellec P., Blunk T., Müller R.H., Verbavatz J.M. and Langer R. (1995) The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **16**, 215-233.
- 15) Soppimath K.S., Aminahavi T.M., Kulkarni A.R. and Rudzinski W.E. (2001) Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* **70**, 1-20.
- 16) Tabata Y. and Ikada Y. (1988) Effect of size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials* **9**, 356-362.
- 17) Petrak K. (1993) *Design and properties of particulate carriers for intravascular administration*. In: A. Rolland (Ed), *Pharmaceutical Particulate Carriers*. Marcel Dekker, New York.
- 18) Gref R., Minamitake Y., Peracchia M.T., Trubetskoi V. and Langer R. (1994) Biodegradable, long-circulating polymeric nanoparticles. *Science* **263**, 1600-1603.
- 19) Bazile D., Prud'Homme C., Bassoullet M., Marlard M., Spenlehauer G. and Veillard M. (1995) Stealth Me-PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocyte system. *J. Pharm. Sci.* **84**, 493-498.
- 20) Gref R., Miralles G. and Dellacherie E. (1999) Polyoxyethylene-coated nanospheres: effect of coating on zêta potential and phagocytosis. *Polymer Int.* **48**, 251-256.
- 21) Illum L. and Davis S.S. (1983) Effect of the non-ionic surfactant poloxamer 338 on the fate and deposition of polystyrene microspheres following intravenous administration. *J. Pharm. Sci.* **72**, 1086-1089.
- 22) Illum L., Davis D.S., Müller R.H., Mak E. and West P. (1993) The organ distribution and circulation time of intravenously injected colloidal carriers sterically stabilized with a block copolymer poloxamine 908. *Int. J. Pharm.* **89**, 25-31.
- 23) Torchilin V.P. (1998) Polymer-coated long-circulating microparticles pharmaceuticals. *J. Microencapsul.* **15**, 1-19.
- 24) Liu Y. and Fortier G. Surface modification of microparticles and evaluation of the stability of loaded enzymes. To be submitted.

- 25) Fortier G. and Laliberté M. (1993) Surface modification of horseradish peroxidase with poly(ethylene glycol)s of various molecular masses. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **17**, 115-130.
- 26) He P., Jean-Francois J. and Fortier G. Poly(ethylene glycol)-albumin hydrogel microspheres for controlled delivery of bioactive agents: Synthesis and *in vitro* characterization. To be submitted.
- 27) Habeeb C. (1966) Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzene sulfonic acid. *Anal. Biochem.* **14**, 328-336.
- 28) El-Mahdy M., Ibrahim E.S., Safwat S., El-Sayed A., Ohshima H., Makino K., Muramatsu N. and Kondo T. (1998) Effects of preparation conditions on the monodispersity of albumin microspheres. *J. Microencapsul.* **15**, 661-673.
- 29) Muramatsu N. and Kondo T. (1995) An approach to prepare microparticles of uniform size. *J. Microencapsul.* **12**, 129-136.
- 30) Li Y.P., Pei T.Y. Zhang X.Y., Gu Z.H., Zhou Z.H., Yuan W.F., Zhou J.J., Zhu J.H. and Gao X.J. (2001) PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers :synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J. Control. Release.* **71**, 203-211.
- 31) Dunn S.E., Brindley A., Davis S.S., Davies M.C. and Illum L. (1994) Polystyrene-Poly(ethylene glycol) (PS-PEG2000) particles as model systems for site specific drug delivery. 2. The effect of PEG surface density on the *in vitro* cell interaction and *in vivo* distribution. *Pharm. Res.* **11**, 1016-1022.
- 32) Fontana G., Licciardi M., Mansueto S., Schillaci D. and Giammona G. (2001) Amoxicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles : Influence of PEG coating on the particle size, drug release rate and phagocytic uptake. *Biomaterials.* **22**, 2857-2865.
- 33) Walday P., Tolleshaug H., Gjoen T., Kindberg G.M., Berg T., Skotland T. and Holtz E. (1994) Biodistributions of air-filled albumin microspheres in rats and pigs. *Biochem. J.* **299**, 437-443.
- 34) Araujo L., Lobenberg R. and Kreuter J.(1999) Influence of the surfactant concentration on the body distribution of nanoparticles. *J. Drug Target.* **6** (5), 373-385.
- 35) Sukow W.W., Sandberg H.E., Lewis E.A., Eatough D.J. and Hansen L.D. (1980) Binding of the Triton X series of non-ionic surfactants to bovine serum albumin. *Biochemistry.* **19**, 912-917.

- 36) Romer-Cano M.S., Martin-Rodriguez A. and de las Nieves F.J. (2000) Adsorption and desorption of Triton X-100 in polystyrene particles with different functionalities : II. Desorption study. *J. Colloid Interface Sci.* **227**, 329-333.
- 37) Moghimi S.M. and Hunter A.C. (2000) Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *TIBTECH.* **18**, 412-420.
- 38) Patel K.R., Li M. P. and Baldeschwieler J.D. (1983) Suppression of liver uptake of liposomes by dextran sulfate 500. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6518-6522.
- 39) Abra R.M., Bosworth M.E. and Hunt C.A. (1980) Liposome disposition *in vivo*: effects of pre-dosing with liposomes. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **29**, 349-360.
- 40) Moghimi S.M. and Gray T. (1997) A single dose of intravenously injected poloxamine-coated long-circulating particles triggers macrophage clearance of subsequent doses in rats. *Clinical Science* **93**, 371-379.
- 41) Storm G., Belliot S.O., Daemen T. and Lasic D.D. (1995) Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **17**, 31-48.
- 42) Chouly C., Pouliquern D., Lucet I., Jeune J.J. and Jallet P. (1996) Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI : effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J. Microencapsul.* **13**, 245-255.
- 43) Li Y.P., Pei Y.Y., Zhou Z.H., Zhang X.Y., Gu Z.H., Ding J., Zhou J.J., Gao X.J. and Zhu J.H. (2001) Stealth polycyanoacrylate nanoparticles as tumor necrosis factor- $\alpha$  carriers : Pharmacokinetics and anti-tumour effects. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 662-665.
- 44) Panagi Z., Beletsi A., Evangelatos G., Livanidou E., Ithakissios D.S. and Avgoustakis K. (2001) Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **221**, 143-152.

## CAPTIONS

### Figure 1:

**Size distribution of RSA-PEG (Figure A) and BSA-PEG (Figure B).** These microparticles were synthesized by emulsion technique using a propeller rotation set at 4,000 rpm at room temperature. All measurements were performed under stirring in PBS, pH 7.4, in triplicate at room temperature.

### Figure 2:

**Effect of size of the microparticle on the final biodistribution of PEG-albumin microparticles.**

Anesthetized rats were injected intravenously in the tail with 5 $\mu$ Ci/kg of native radioactive albumin-PEG microparticles of various sizes. 3 $\mu$ m BSA-PEG microparticles ( $\square$ ), 3 $\mu$ m RSA-PEG microparticles( $\text{///}$ ) and 10 $\mu$ m BSA-PEG microparticles ( $\blacksquare$ ) prepared in absence of Triton and 3.75 $\mu$ m BSA-PEG microparticles prepared in the presence of Triton ( $\text{||}$ ) were administered to the rats. Animals were sacrificed 5 h after injection. Data is the average of 3-4 rats. \* Statistically significant differences ( $p < 0.0001$  vs 10 $\mu$ m microparticles in liver); \*\* ( $p < 0.0001$  vs 10 $\mu$ m microparticles in spleen).

### Figure 3:

**Effect of Triton X-100 on blood clearance of 3 $\mu$ m RSA-PEG and BSA-PEG microparticles.**

Anesthetized rats were injected intravenously in the tail with 5 $\mu$ Ci/kg of various preparations of native radioactive albumin-PEG microparticles. 3 $\mu$ m BSA-PEG microparticles ( $\bullet$ ) and 3 $\mu$ m RSA-PEG microparticles ( $\circ$ ) were prepared in the absence of Triton while 3.75 $\mu$ m BSA-PEG microparticles ( $\square$ ) were prepared in the presence of Triton. Animals were sacrificed 3 to 4 h after injection. Data is the average of 3 to 4 rats.

### Figure 4 :

**Effect of multiple injections on blood clearance of 3 $\mu$ m BSA-PEG microparticles.**

Anesthetized rats were injected intravenously in the tail with 5 $\mu$ Ci/kg of native radioactive BSA-PEG microparticles. These microparticles were 3 $\mu$ m in diameter and prepared in the absence of Triton. Each animal received three injections at 0, 30 and 70 min, respectively. Animals were sacrificed 4 h after the first injection. Data is the average of 3 rats.

**Figure 5 :****Effect of surface nature on the biodistribution of 3 $\mu$ m BSA-PEG microparticles.**

Anesthetized rats were injected intravenously in the tail with 5 $\mu$ Ci/kg of various preparations of BSA-PEG microparticles. Native (///), aminated ( $\square$ ), Pegylated (||) and lipidated ( $\blacksquare$ ) BSA-PEG microparticles were 3 $\mu$ m in diameter and prepared in the presence of Triton. Animals were sacrificed 5 h after injection. Data is the average of 5-12 rats. \* Statistically significant differences ( $p < 0.0019$  vs 3 $\mu$ m lipidated microparticles in lung); \*\* ( $p < 0.0005$  vs 3 $\mu$ m lipidated microparticles in liver).

**Figure 6 :****Blood clearance of different doses of lipidated 3 $\mu$ m BSA-PEG microparticles.**

Anesthetized rats were injected intravenously in the tail with different doses of radioactive lipidated BSA-PEG microparticles 3 $\mu$ m in diameter. A low dose of 0.59 $\mu$ Ci/kg ( $\bullet$ ) and a high dose of 11 $\mu$ Ci/kg ( $\circ$ ) of 3 $\mu$ m radioactive lipidated BSA-PEG microparticles were used. Both doses were prepared in the presence of Triton. Animals were sacrificed 5 h after injection. Data is the average of 3 to 5 rats. Error bars are omitted for sake of clarity.

**Figure 7 :****Blood clearance of 5 $\mu$ Ci/kg of aminated and native microparticles.**

Anesthetized rats were injected intravenously in the tail with 5 $\mu$ Ci/kg of aminated ( $\bullet$ ) or native ( $\circ$ ) radioactive BSA-PEG microparticles 3 $\mu$ m in diameter and prepared in the presence of Triton. Animals sacrificed 5 h after injection. Data is the average of 3 rats. Error bars are omitted for sake of clarity.

**Figure 8 :****Blood clearance of 11 $\mu$ Ci/kg of aminated, PEGylated and lipidated microparticles.**

Anesthetized rats were injected intravenously in the tail with 11 $\mu$ Ci/kg of aminated ( $\bullet$ ) PEGylated ( $\circ$ ) or lipidated ( $\square$ ) radioactive BSA-PEG microparticles 3 $\mu$ m in diameter and prepared in the presence of Triton. Animals were sacrificed 5 h after injection. Data is the average of 5 to 7 rats. Error bars are omitted for sake of clarity.



**Table I**

Physical characteristics of albumin-PEG microspheres

Microparticle	Protein	Diameter ( $\mu\text{m}$ )	Span	Zeta potential (mV)
Native	BSA	$10.43 \pm 0.22$	$1.38 \pm 0.12$	$-24.55 \pm 1.90$
Native	RSA	$3.26 \pm 0.05$	$0.54 \pm 0.02$	$-19.96 \pm 1.12$
Native	BSA	$3.66 \pm 0.01$	$0.66 \pm 0.03$	$-19.50 \pm 0.67$
Aminated	BSA	$3.35 \pm 0.01$	$0.51 \pm 0.01$	$-11.61 \pm 0.95$
PEGylated	BSA	$3.17 \pm 0.04$	$0.77 \pm 0.01$	$-18.19 \pm 1.84$
Lipidated	BSA	$4.27 \pm 0.39$	$1.02 \pm 0.17$	$-14.01 \pm 1.24$

Synthesis was carried out at room temperature, using PEG of 2000 Da of molecular mass. The rotation of the propeller was set at 4000rpm. Concentrations of reagents and procedure were similar to those described in Materials and Methods. All measurements were done in triplicata from two different batches.

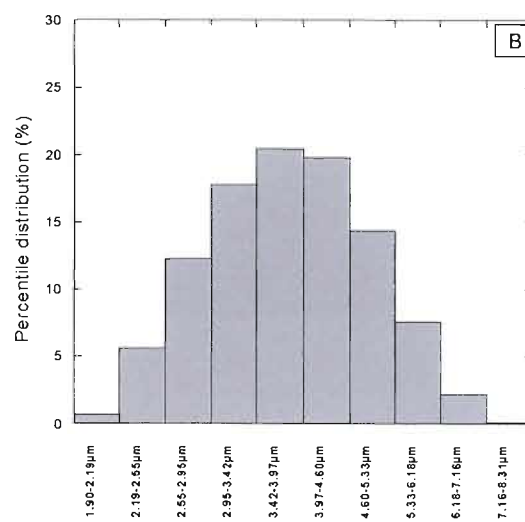
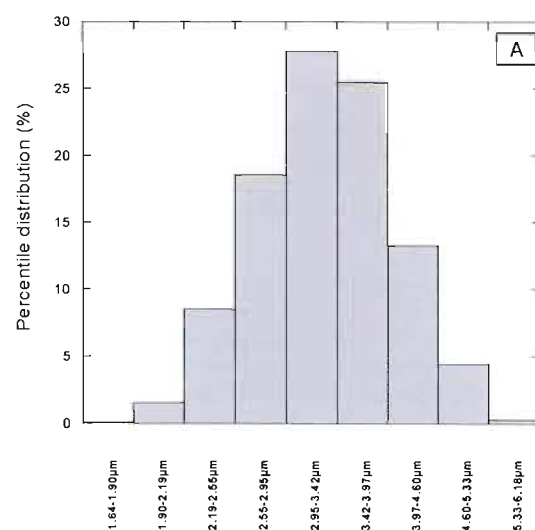
**Table 2**

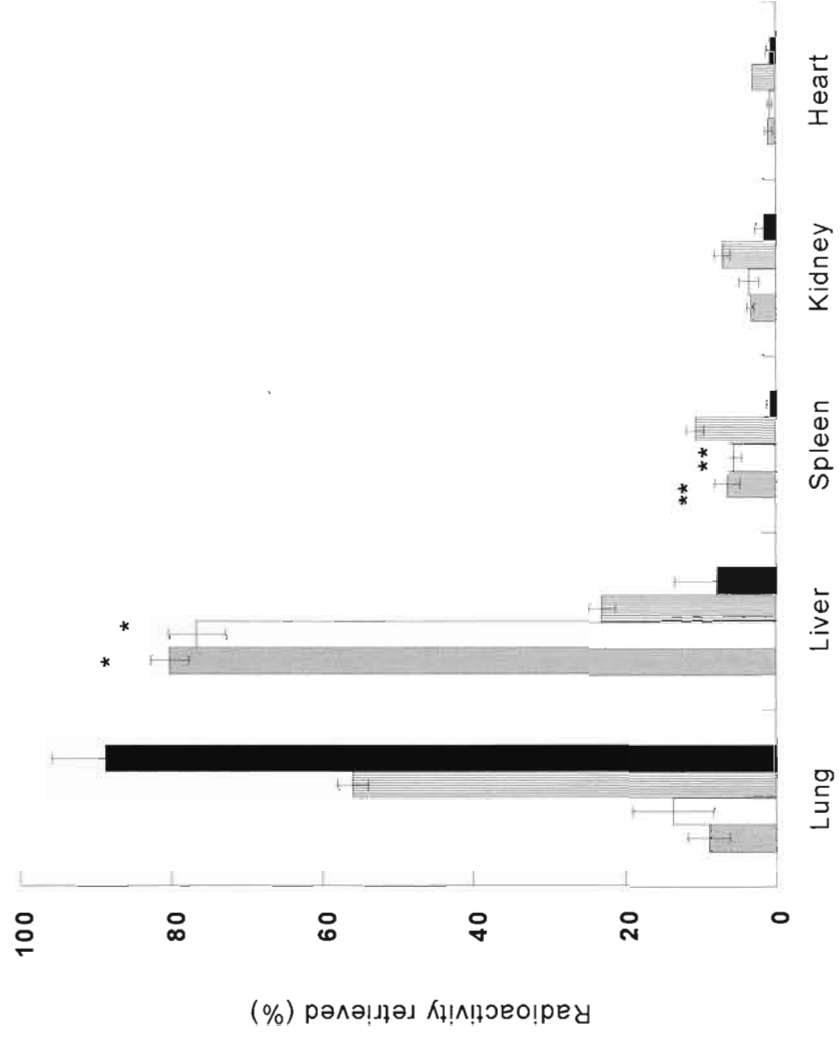
Pharmacokinetic parameters of the various preparations of modified or native microparticles PEG-RSA obtained after intravenous injection in rats.

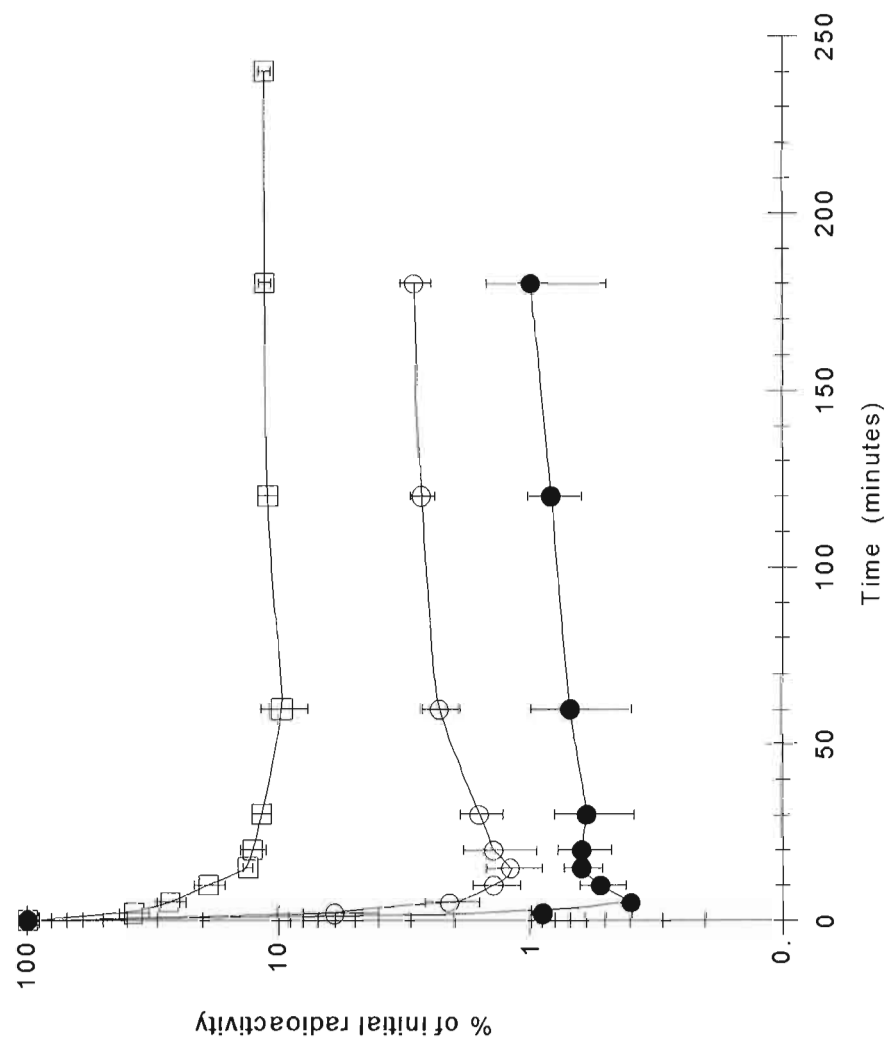
Particle	$T_{1/2\alpha}$ (h) <sup>a)</sup>	$T_{1/2\beta}$ (h) <sup>b)</sup>	$K_{c \rightarrow p}$ (h <sup>-1</sup> ) <sup>c)</sup>	$K_{p \rightarrow c}$ (h <sup>-1</sup> ) <sup>d)</sup>	$K_e$ (h <sup>-1</sup> ) <sup>e)</sup>	AUC (% dose.h.ml <sup>-1</sup> ) <sup>f)</sup>
Native*	0.27 ± 0.03	6.43 ± 0.09	1.59 ± 0.36	0.66 ± 0.15	0.42 ± 0.09	215 ± 54
Aminated	0.15 ± 0.02	7.95 ± 2.15	1.58 ± 0.60	3.00 ± 0.14	0.13 ± 0.05	733 ± 286
Pegylated	0.18 ± 0.01	8.65 ± 1.04	2.43 ± 0.41	1.26 ± 0.21	0.25 ± 0.04	430 ± 73
Lipidated	0.16 ± 0.01	7.03 ± 1.62	2.44 ± 0.61	1.75 ± 0.21	0.25 ± 0.06	390 ± 109

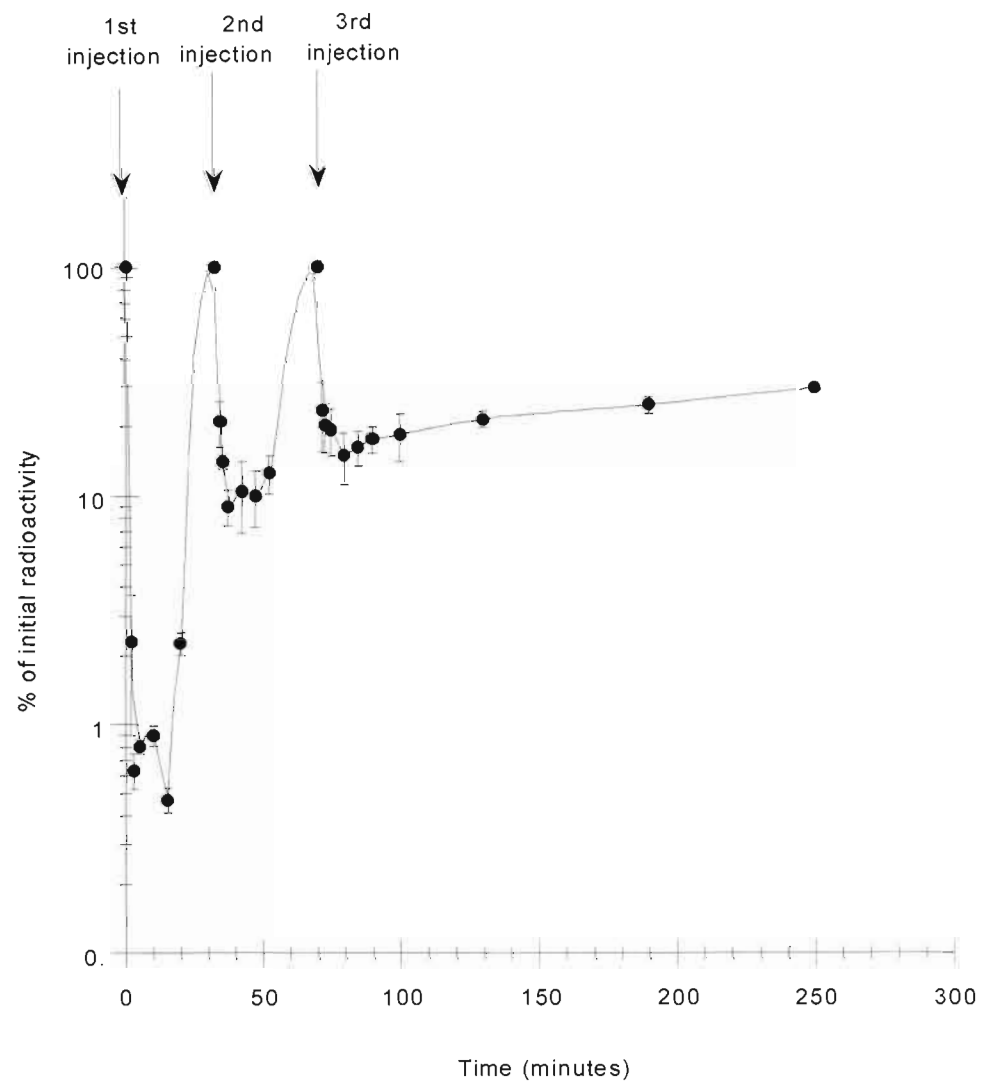
a)  $T_{1/2\alpha}$ , plasma half-life in the alpha phase. b)  $T_{1/2\beta}$ , plasma half-life in the beta phase. c)  $K_{c \rightarrow p}$ , transport rate constant from central compartment to peripheral compartment. d)  $K_{p \rightarrow c}$ , transport rate constant from peripheral compartment to central compartment. e)  $K_e$ , elimination rate constant from central compartment. f) AUC, area under the plasma concentration curve.

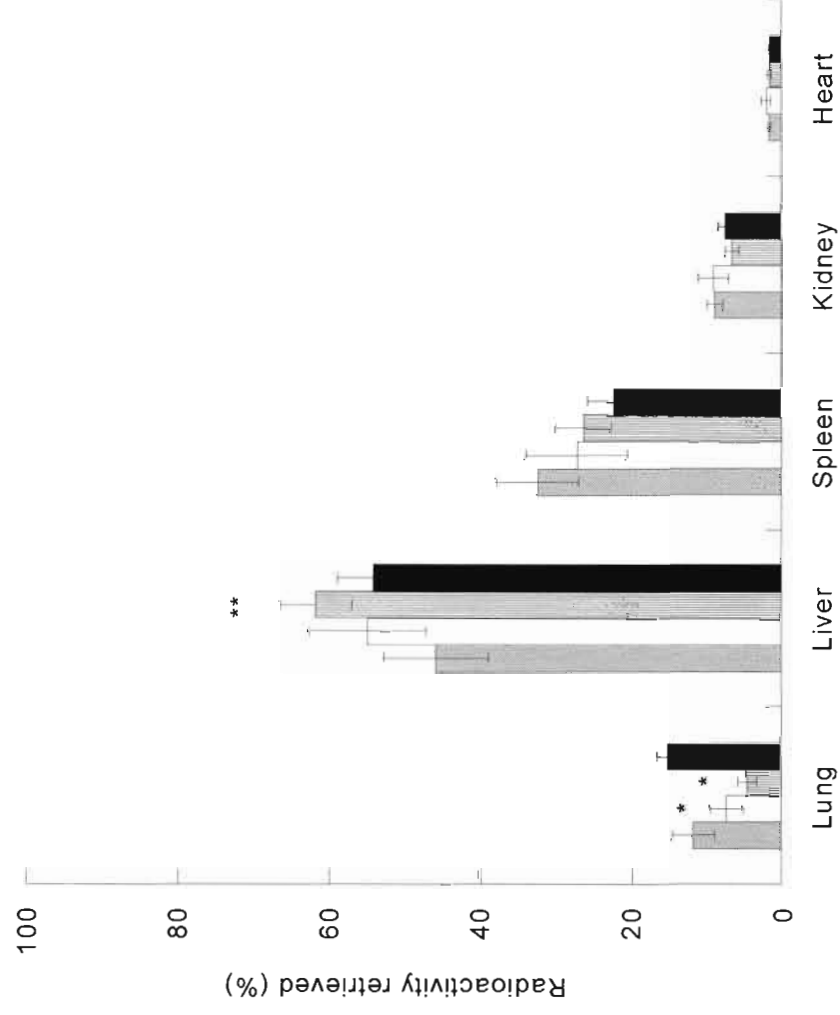
\* All microparticles were injected in rats at a dose of 11 μCi/kg except for native microparticles which were injected at a dose of 5 μCi/kg. Means and standard deviations of the pharmacokinetic parameters were calculated from groups of 5-7 rats. Calculation of pharmacokinetics parameters was based on a bicompartiment model of the blood clearance curves as described in Materials and Methods.

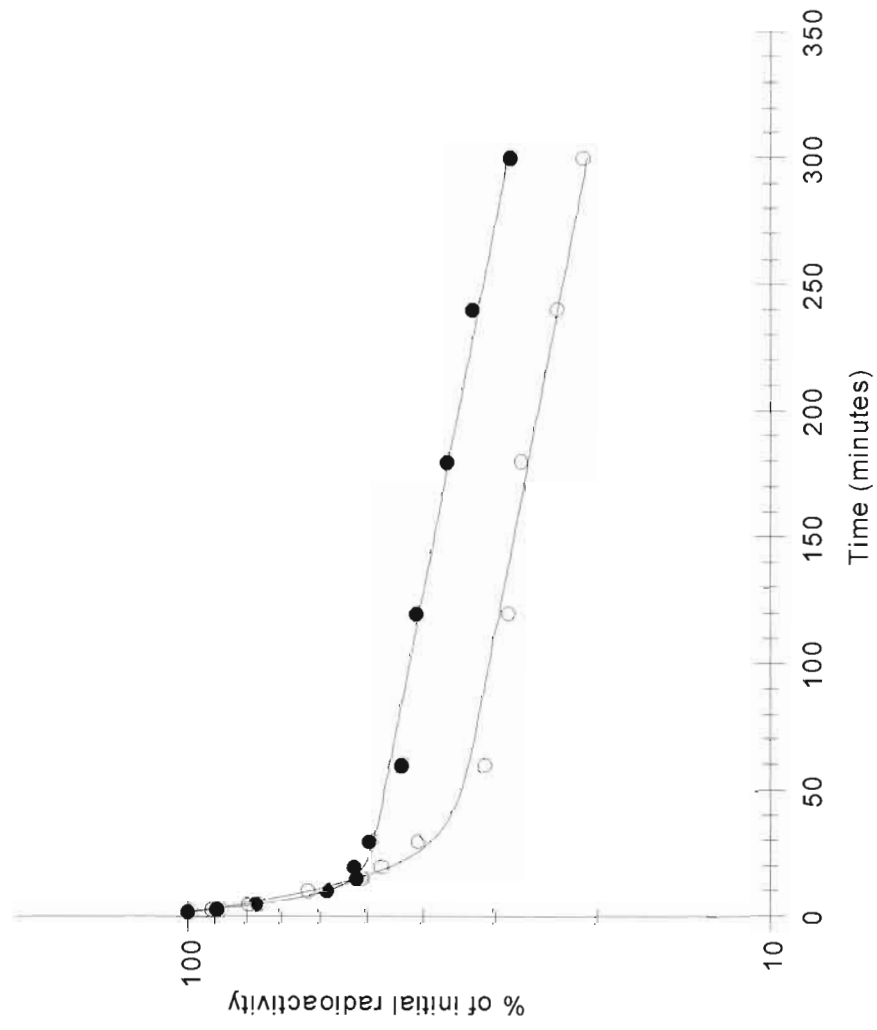




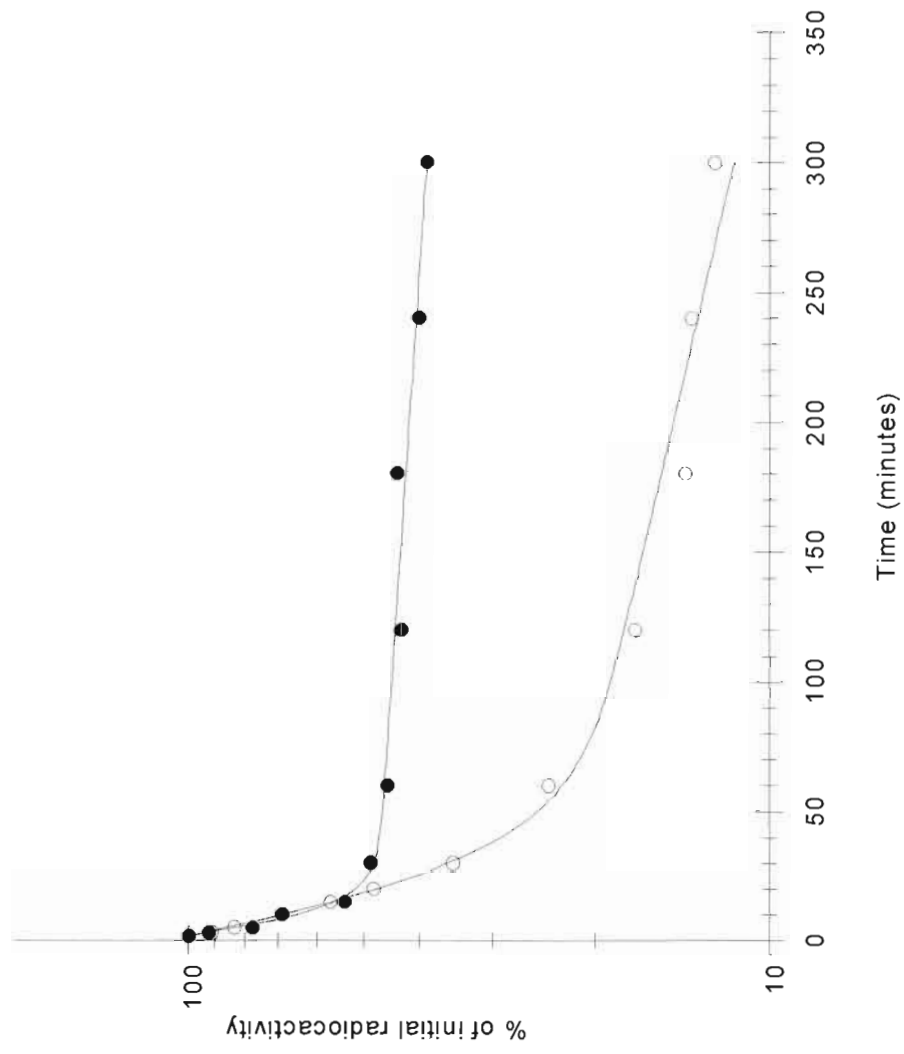


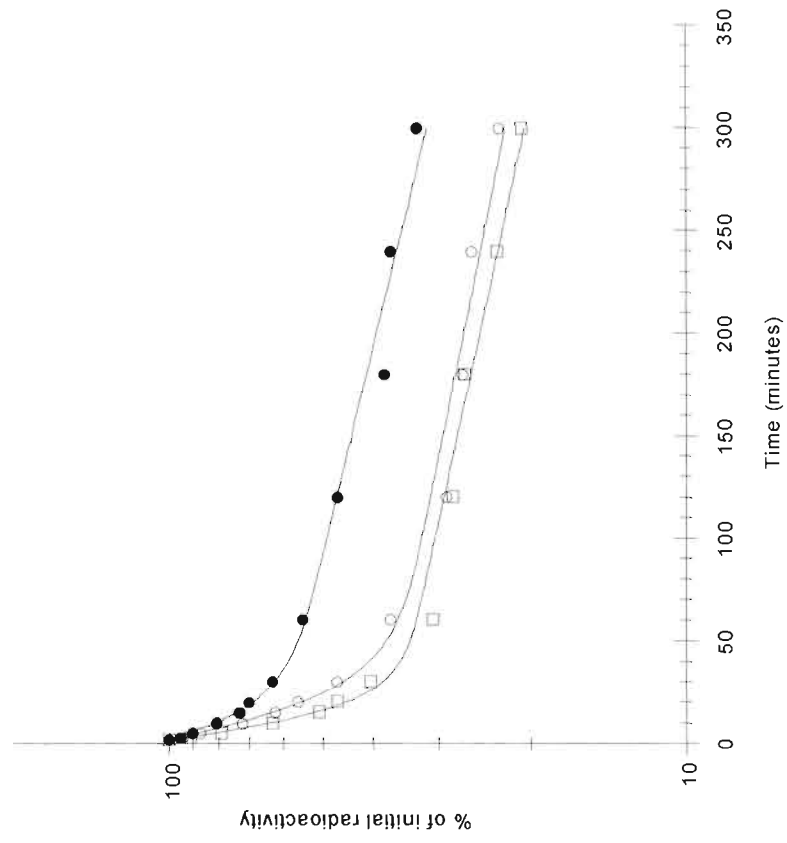












## **Réponses cellulaire et biochimique à court terme de rats injectés avec des microparticules d'hydrogel de RSA-PEG dans la cavité péritonéale.**

J. Jean-François and G. Fortier\*

Laboratoire d'enzymologie appliquée

Département de chimie-biochimie, Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montréal Qc H3C3P8

La cavité péritonéale du rat a été utilisée pour évaluer les réponses cellulaire et biochimique à court terme de quatre préparations de microparticules de  $3\mu\text{m}$  à base d'albumine sérique de rat (RSA) et de poly(éthylène glycol). Du salin et du thioglycollate ont été respectivement employés comme contrôle négatif et positif de l'inflammation dont le principal marqueur est le macrophage activé. La prolifération et les caractéristiques fonctionnelles de ce dernier diffèrent du macrophage quiescent. Après cinq jours, les rats traités au thioglycollate doubaient leur nombre de cellules et montraient une activité leucine aminopeptidase (LAP) et un niveau de phagocytose supérieurs aux groupe traités avec du salin. Les rats injectés avec des microparticules de  $3\mu\text{m}$  de RSA-PEG natives, aminées, PEGylées ou lipidées à une dose de 250mg/kg montraient des résultats similaires à ceux traités avec du salin à l'exception de la phagocytose. Après injection, toutes les formulations de microparticules de RSA-PEG de  $3\mu\text{m}$  induisaient une réponse phagocytaire plus élevée d'au plus 25% que le salin chez les macrophages péritonéaux. Les microparticules natives (-19mV) et PEGylées (-18mV) à probablement à cause de la similitude de leur potentiel zêta induisaient une réponse phagocytaire similaire. Les microparticules aminées (-11mV) étaient phagocytées deux fois moins vite que les natives. Des injections multiples des préparations de microparticules de  $3\mu\text{m}$  de RSA-PEG induisaient une diminution de la quantité de cellules mais une activité phagocytaire supérieure après deux ou trois injections qu'après une. L'activité LAP augmentait seulement après la troisième injection. En conclusion à une dose de 250mg/kg, les quatre formulations de microparticules de RSA-PEG de  $3\mu\text{m}$  étaient relativement inoffensives parce que la réponse inflammatoire induite était similaire à celle induite par une injection de solution saline.

## **Cellular and biochemical short-term responses to RSA-PEG hydrogel microparticles injected in rat peritoneum.**

J. Jean-François and G. Fortier\*

Laboratoire d'enzymologie appliquée

Département de chimie-biochimie, Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montréal (Québec) Canada H3C 3P8

**Keywords :** Macrophages, rat, peritoneum, microparticle, hydrogel, rat serum albumin, poly(ethylene glycol), cellular response, modified microparticles, phagocytosis.

**Short running title :** Peritoneal injection of RSA-PEG microparticles.

\*to whom correspondence should be sent

Dr G. Fortier  
Laboratoire Enzymologie Appliquée  
Dép. Chimie-Biochimie  
Université du Québec à Montréal  
C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal (Québec),  
Canada H3C3P8  
Tel : 514-987-4455  
Fax : 514-987-4054  
fortier.guy@uqam.ca

**ABSTRACT**

The rat peritoneal cavity was used to evaluate the cellular and biochemical short-term response to various preparations of RSA-PEG hydrogel microparticles of 3 $\mu$ m in diameter. Sterile Phosphate Buffer Saline (PBS) and thioglycollate (250mg/kg) were used as negative and positive controls of peritoneal inflammation, respectively. One of the important markers of peritoneal inflammation, following challenge with an immunostimulant agent, is the transformation of the quiescent resident macrophage population into an activated macrophage population whose proliferation rate and functional characteristics differ from the quiescent macrophage. Five days after injection, thioglycollate-treated rats showed a two-fold increase in macrophage numbers and a higher leucine aminopeptidase (LAP) and phagocytic activities when compared to rats treated with PBS solution. Rats injected with native, aminated, PEGylated or lipidated 3 $\mu$ m RSA-PEG microparticles at a dose of 250mg/kg, showed results similar to the PBS-treated group, except for a higher phagocytic activity of the macrophages. Phagocytosis stimulation did not however exceed 25%. Peritoneal macrophages retrieved from rats injected with PEGylated microparticles (-18mV) showed phagocytic activity levels similar to those rats injected with native particles (-19mV) while macrophages retrieved from rats injected with aminated microparticles (-11mV) showed a two fold reduction in phagocytic activity; indicating an influence of the zeta potential. Multiple intraperitoneal injections of native 3 $\mu$ m RSA-PEG microparticles reduced cell numbers but higher level of phagocytic activity was observed after the second or the third injection than after the first one. LAP activity increased only after the third injection. In conclusion at 250mg/kg, all preparations of 3 $\mu$ m RSA-PEG microparticles were innocuous and the magnitude of the inflammatory response elicited was very similar to the one elicited by PBS.

## INTRODUCTION

A large number of polymers has been implanted in the human body as surgical devices or drug delivery systems. The peritoneal cavity of small animals such as mice and rats has been extensively used to evaluate the biocompatibility of polymeric materials. The biocompatibility is assessed by the magnitude of the cellular and humoral responses observed, which are indicative of the inflammatory process induced by the presence of the polymeric implant in the peritoneal cavity of the host. The immune response is a function of the physicochemical properties of the material such as chemical composition, geometry and size, surface charge and hydrophilic nature [1-3]. The peritoneum is well adapted to this kind of study because it is a clearly defined zone from which cells can be easily isolated [4]. Another advantage of using the peritoneal cavity is that biomaterials can be injected as suspensions into it, avoiding wound healing associated with invasive surgical procedures.

Colloidal suspensions (microparticles or nanoparticles) are gaining in popularity as drug delivery systems. However, their biocompatibility has to be assessed before their use in the clinic. Because of their size ranges (10 to 10,000 nm), microparticles and nanoparticles are susceptible to be phagocytosed by macrophages. These cells have a pivotal role in the processing of foreign material for their elimination. They are the most important phagocytic cells in the initial response to particulate material and their reaction may result in local and in systemic effects [5]. Studies have demonstrated that peritoneal inflammation elicited by pro-inflammatory agents such as thioglycollate or by immune stimulation, increases not only the number of peritoneal cells but influences also the biochemical and functional properties of the resident macrophages. Peritoneal

macrophages activated by thioglycollate showed higher lysosomal enzyme activities (esterase, acid phosphatase, cathepsins B and D) which are important for the destruction of ingested particles within phagolysosomes [6]. Other changes reported include a disruption of normal activity level of various ectoenzymes. For example, an increase in leucine aminopeptidase [LAP] activity and a decrease in 5'-nucleotidase activity was observed. Plasma membranes of activated macrophages also ruffle and enlarge while cells exhibit a higher level of pinocytosis and phagocytosis activities [6-8]. Inflammatory processes altered the hepatic synthesis of a specific class of serum proteins, known as the acute phase proteins. Under these inflammatory conditions, the levels of albumin and retinol-binding protein decrease well under their normal baseline values in the rat, while the levels of ceruloplasmin,  $\alpha_1$ -antitrypsin and C-reactive protein are increased [9].

The aim of this study is to evaluate the biocompatibility and short-term cellular responses in the rat, following an intraperitoneal injection of microparticles made of poly(ethylene glycol)-albumin hydrogel. These microparticles have a high potential as a drug delivery system and as an immobilization matrix for therapeutic enzymes. This evaluation will be based on the changes in metabolic (ectoenzymes) and functional (phagocytosis) properties of the peritoneal resident macrophages and on variation of the albumin level. The effect of the surface chemistry of the microparticles and the injection regimen (one vs multiple injections) will be studied in relation to macrophage activation. The results of this study will allow assessment as to whether or not our biomaterial can be a safe matrix for use *in vivo*.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Materials**

Rat serum albumin (RSA), leucine aminopeptidase (LAP) from porcine kidney, leucine p-nitroanilide, bromocresol green, Fast Red RC salt, Trypan blue,  $\alpha$ -naphthyl acetate, sodium fluoride, methoxy poly(ethylene glycol) of molecular weight 5000Da (mPEG), poly(ethylene glycol) of molecular weight 2000Da (PEG), 4-nitrophenyl chloroformate and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC) were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Minimal essential medium (MEM) was purchased from Gibco BRL (Rockville, MD, USA). Triton was purchased from Fluka MG (Germany). Ethylene diamine (EDA), palmitoyl chloride and triethyl amine were purchased from Aldrich (St Louis, Mo, USA). 1,4-dioxane was purchased from BDH (Toronto, Canada). Thioglycollate Medium Brewer modified was purchased from Becton Dickinson (Sparks, MD, USA). Fetal calf serum (FCS), monoclonal antibody ED1 (mAb ED1) anti-rat monocytes and macrophages were purchased from Mediacorp (Montreal, Canada). Dyed fluorescent microspheres (2.03 $\mu$ m) were purchased from Bangs Laboratories (Fishers, IN, USA). Male Sprague-Dawley rats (200-250g) were obtained from Charles Rivers (St-Constant, Canada).

### **Methods**

#### **Activation of PEG**

The activation of PEG (M.W. 2kDa) and mPEG (M.W. 5kDa) was performed with 4-nitrophenyl chloroformate according to a published procedure [10]. The resulting di-p-



nitrophenylcarbonate PEG or p-nitrophenyl carbonate m-PEG were stored at -20°C. All reagents were of purest grade available.

### **Synthesis of microparticles**

Synthesis of the microparticles was carried out as described before in a thermostated beaker containing 240ml of cottonseed oil under stirring (4000rpm) provided by a Cole-Parmer® Servodyne electronic mixer [11]. The synthesis is initiated into the oil phase by a bolus injection of 500µl of reagents containing 1 part of RSA, 100mg/ml of 400mM borate buffer, pH 9.4 and 1 part of activated bifunctional PEG 2K at a concentration of 270mg/ml of water. The speed of the propeller was gradually decreased to 1500 rpm during the next 6 hours. At this time, the reaction is stopped. Fifty ml of pentane were added to the beaker and the mixture was centrifuged at 10,000 rpm for 15min in an IEC B-204 centrifuge. The microparticles were washed 3 times in Phosphate Buffered Saline (PBS) solution, pH 7.4 (137mM NaCl, 5mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) and stored at 4°C until further use.

### **Characterization of microparticles**

#### ***Size measurements***

Size measurements of hydrogel microparticles were performed by light diffraction with a Malvern 2600 Series particle size analyzer. The light source was provided by a helium-neon laser. Briefly, a volume of microparticles was diluted in a cuvet containing 25ml of PBS to obtain, before size measurement, a volume concentration of 0.007%. The sample was then measured and particle mean diameter and span were calculated by the software "Operating System SB.OB". The span corresponds to the width of the volume distribution relative to the median diameter of the microparticle and is defined as:

$$Span = (D_{90\%} - D_{10\%}) / D_{50\%} \quad \text{eq.1}$$

where  $D_{x\%}$  is the diameter at the indicated percentage point.

### ***Zeta potential measurements***

The Zeta potential of the various hydrogel microparticles was measured using Zeta Plus, a zeta potential analyzer working with a solid state laser (red, 676nm wavelength) (Brookhaven Instruments, New York, USA). Samples were prepared in 1mM KCl solution and transferred in a specially designed polystyrene cuvet (Brookhaven Instruments, New York, USA) in which an electrode was inserted. Before measurements, the conductance must have a value of  $320\mu\text{S} \pm 10\%$ . Measurements were then performed and the data were generated as a distribution of zeta potential.

### **Chemical modifications of the surface of the microparticles**

#### ***Amination of the microparticle surface***

Surface amination was carried out as described before [12]. One gram of hydrated microparticles were suspended in 1.2 ml of PBS buffer, pH 7.4, containing 0.1% of Triton X-100. The pH was adjusted at 3.5 by adding HCl 5.0N. An amount of EDAC was added to obtain a 8:1 molar ratio with the carboxyl groups brought by 1 g of microparticles. HCl was used to keep the pH constant. After 5 min of incubation at room temperature, the reaction was stopped by increasing the pH to 10 using NaOH 3.0 N. Then 0.3 ml of TEA was added along with ethylenediamine at a molar ratio of 4:1 based on the carboxyl groups of microparticles. The reaction was carried out at room temperature for 2 h and was stopped by adding 50 mM of phosphate buffer, pH 5.0.

Microparticles were collected by centrifugation at 16 000rpm for 30min in an IEC B-204 centrifuge. After centrifugation, microparticles were washed five times in 12.5mM borate buffer solution, pH 8.5. The recovered microparticles were stored in 12.5mM borate buffer, pH 8.5, containing 0.02% NaN<sub>3</sub> at 4°C.

#### ***Surface PEGylation of the microparticles***

Surface PEGylation was carried out as described before [12]. One gram of aminated microparticles was suspended in 3.5 ml of 100 mM borate buffer, pH 9.4, and activated mPEG<sub>5,000</sub> was added at a molar ratio of 4:1 to the total amino groups of aminated microparticles determined by the TNBS assay. After 3h of reaction at room temperature, microparticles were washed several times with borate buffer solution until all *p*-nitrophenol was eliminated.

#### ***Surface lipidation of the microparticles***

Surface lipidation was carried out as described before [12]. One gram of aminated microparticles was suspended in a mixture containing 2.7 ml of 1,4-dioxane and 0.3 ml of TEA. Then, 30 µl of palmitoyl chloride was added and the reaction was carried out at room temperature for 3 h. Microparticles were recovered by centrifugation at 16000rpm during 30min in an IEC B-204 centrifuge and washed twice with 1,4-dioxane to eliminate free palmitic acid and then washed thoroughly with borate buffer solution.

#### **Animal treatment**

Male Sprague Dawley rats (250-300g) were used. In all experiments, positive and negative controls were obtained by intraperitoneal injection of 3ml of a 3% (w/v)

thioglycollate solution or 3ml PBS solution, respectively. Treated animals were injected intraperitoneally with 250mg/kg of microparticles. The animals were sacrificed 5 days after the injection. For multiple injections studies, injections were performed each five days.

## **Biochemical studies**

### ***Isolation of rat peritoneal macrophages***

Five days after treatment, male Sprague Dawley rats (250-300g) were sacrificed with CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> and their peritoneal cavity was washed five times with 5 ml of Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), pH 7.4 (0.5mM KCl, 0.04mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.08mM MgSO<sub>4</sub>, 13.6mM NaCl, 2.6mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.03mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.006mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5mM glucose). The HBSS washes were pooled and centrifuged at 1 000rpm for 10 minutes in an IEC Centra-7R centrifuge. The red cells were lysed with distilled water [13]. After a second centrifugation, cell pellets were suspended in 2ml of HBSS to determine cell viability. Cell count and viability were performed in a bright-line haemocytometer. The cell viability was assessed as 85% by exclusion of Trypan Blue.

### ***Characterization of peritoneal cells***

Cells isolated from the peritoneal cavity were identified by a cytochemical assay and by flow cytometry. The cytochemical assay was the non-specific esterase assay and was performed according to the procedure of Ennist and Jones [14]. Briefly, 2.5mg of  $\alpha$ -naphthyl acetate were dissolved in 0.5ml of methanol and mixed with 12.5ml of a 50mM sodium phosphate buffer at pH 7.8. Then, 12.5mg of Fast Red RC diazotized salt were

added under stirring until dissolved. The solution was filtered through a Whatman filter paper # 42. An aliquot of the cell suspension and the staining solution were mixed together in the proportion of 1:5 and were incubated for 20 min at 20°C. Esterase-positive cells appeared red-brown under an optical light microscope.

The flow cytometric assay consisted in incubating 1ml of peritoneal cell exudate with 20µl of FITC-ED1 monoclonal antibody during 30 min in the dark at 4°C [15]. At the end, cells were centrifuged 2 times in an IEC Centra-7R centrifuge at 1000rpm for 5min and the cell pellet was suspended with 2 ml of PBS before analysis using a FACScan (Becton Dickinson, San Jose, USA).

***Non-specific esterase and non-specific esterase NaF-resistant assays.***

This assay was adapted from the procedure of Sonne et al. [16]. Ten microliters of the peritoneal cell suspension at  $1.5 \times 10^7$  cells/ml of buffered solution containing 150mM NaCl, pH 7.6, were transferred into the well of flat-bottom 96-well plates. Twenty-five microliters of Hepes-buffered saline or 25µl of a 0.5M sodium fluoride solution were added to the wells. The assay was started by the addition of 100µl of freshly prepared alpha-naphtyl acetate solution (5mg of alpha-naphtyl acetate dissolved in 1ml ethanol and mixed with 25 ml of the Hepes-buffered saline). The plate was sealed and incubated for 30 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 100µl of a 4% (w/v) SDS solution prepared in 10mM Na-barbital and 100mM sodium acetate, pH 8.0. Fast Red RC salt at 0.2% (w/v) was added just before use to the SDS solution and the solution was filtered through a Whatman filter paper # 41. The absorbance of the solution was read at 485nm using an iEMS microplate reader (Labsystems, USA).

### ***Leucine aminopeptidase assay***

Leucine p-nitroanilide was used as substrate for the LAP assay. Macrophages at a final concentration of  $7.5 \times 10^6$  cells/ml were lysed with freshly prepared 0.05% (v/v) Triton X-100 solution. Three hundred microliters of the lysate were mixed with 800 $\mu$ l of a 0.1M phosphate buffer solution, pH 7.5, preheated to 37°C, and 100 $\mu$ l of substrate solution prepared at 10mM in dimethylsulfoxide were added. The mixture was incubated at 37 °C for 10 min. The reaction was stopped by placing the samples on ice and the absorbance was read at 405nm. A preparation of porcine kidney microsomal LAP was assayed each time as a control. The molar extinction coefficient for p-nitroaniline was 9600M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> [17].

### ***Phagocytosis assay***

The assay was adapted from Uff et al. [18]. Peritoneal cells in MEM containing 10% of FCS were seeded at a concentration of  $10^5$  cells/well into multiwell plates and incubated at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub> for 2h to allow cells to adhere. Plats were washed twice with MEM to remove non-adherent cells. Ten microliters of suspension containing  $10^7$  fluorescent microspheres per ml (Bang Lab) were added to each well and the plate was incubated for 90 min to allow phagocytosis of the beads. Following incubation, the plate was washed 3 times with PBS. Cells were solubilized by adding 150 $\mu$ l of a 25mM Tris-HCl buffer solution, pH 8.5, containing 0.2% (w/v) of SDS and the relative fluorescence of each well at an emission wavelength of 520nm was determined using an excitation wavelength of 480nm. Phagocytosis was expressed as the

amount of fluorescence retrieved per amount of protein per well, determined by the BCA assay.

### ***Colorimetric assay of serum albumin***

A solution of 50mM potassium phosphate solution, pH 7.0, containing  $4 \times 10^{-5}$  M of bromocresol green as indicator was prepared. In a test tube, 15ml of the buffer indicator solution was mixed gently with 0.1ml of serum and the absorbance was read at 615nm. Albumin levels in rat sera were quantified using a standard curve of rat commercial albumin [19].

### **Data analysis**

Statistical analysis was performed with the software proGLM SAS. Data from various regimen injection protocols and concerning the macrophage activation parameters were analyzed by a two-way variance analysis with the Bonferroni test. Data from the effect of the various hydrogel microparticle preparations on macrophage activation parameters were analyzed by one-way ANOVA with the Dunnett test for comparison versus a group control defined as PBS-treated groups.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Cellular composition of peritoneal exudates

Macrophages from the rat peritoneum were chosen as a model to evaluate the short-term cellular response of the 3 $\mu$ m RSA-PEG hydrogel microparticles. The first series of experiments was carried out to evaluate the composition of peritoneal cellular exudates. Three groups of rats were injected with sterile solution containing PBS alone (negative control), 3 $\mu$ m RSA-PEG microparticles (tested material) or thioglycollate salts (positive control). Five days later, cellular exudates were obtained from each group. Flow cytometry analysis based on light scattering of thioglycollate-treated rats show a main population containing about 90% of the cell exudates and having cells with low granularity (Fig. 1A) which are monocytes/macrophages. The second population is a minor one of about 10% of the cell exudates which is composed of cells of intermediate to high granularity mainly neutrophils or mastocytes. Fisker *et al.* in 1990 have reported that peritoneal cell exudates from thioglycollate-treated rats contained a maximum of 95% of macrophages, 5 days after injection of the product [20]. Flow cytometry analysis of the same cell exudates from thioglycollate-treated rats that were incubated in the presence of the monoclonal antibodies ED1, specific to lysosomal membrane antigen ED1 of the monocyte/macrophage, shows only one type of cell population (Fig. 1B). This is also corroborated by the fact that more than 90% of these cell exudates gave a positive esterase reaction (results not shown). Similar results have been obtained for the cell exudates of the other two groups.



### **Kinetics of inflammation markers for single injection**

During peritoneal inflammation, known markers of macrophage activation are induced or increased such as cell number, leucine aminopeptidase activity and phagocytosis [21]. A second series of experiments was then carried out to establish the time-kinetics (3,5,7,10,14 days post injection) for appearance of the various markers related to macrophage activation. At days 3 to 7 post-injection, the cell exudates of the thioglycollate treated rats showed a great increase in the cell number (Fig. 2A), in phagocytosis activity (Fig. 2B) and in LAP activity (Fig. 2D) when compared to cell exudates obtained from PBS-treated rats and hydrogel microparticle-injected rats. However, the level of esterase activity was similar for the 3 groups of rats (Fig. 2C). Rats injected with a dose of 250mg/kg of fresh microparticles showed a slight increase in cell numbers at Day 5 (Fig. 2A) compared to the PBS negative control group. At Days 7 and 10 significant increases in phagocytic activity was reported for rats treated with microparticles (Figure 2B). This can be related to the particulate nature of the biomaterial. LAP activity analysis showed similar decrease for both the PBS-treated rats and hydrogel microparticle-injected rats compared to the thioglycollate-treated group (Fig. 2D).

Peritoneal cell numbers reached a maximum at day 5, for rats injected with microparticles and returned to normal values at day 7 (Figure 2A). There was no major variation in LAP activity in microparticle-injected rats during the 14 day period when compared to the PBS treated group, except at day 10 (Fig. 2D). At day 10, phagocytosis activities retrieved in cell exudates originating from microparticles injected rats was more pronounced, reaching a similar activity as the one observed with thioglycollate-treated

rats (Fig. 2B). The increased phagocytosis activity observed at day 10, although significantly higher for rats injected with microparticles, was not a phenomenon specific to that group since both control groups (PBS and thioglycollate) followed the same pattern (Fig. 2B). This phenomenon could be non-specific and be due to the trauma caused by the injection.

### **Single injection of native and modified microparticles**

For the next series of experiments using 3 $\mu$ m RSA-PEG hydrogel microparticles with different surface modifications, day 5 after the injection was chosen as the time limit at which peritoneal macrophages would be isolated in order to maximize cell number and LAP activity responses. Solutions containing unmodified, aminated, PEGylated or lipidated microparticles along with thioglycollate and PBS solution were injected into the peritoneal cavity of various groups of rats. Five days later, the peritoneal macrophages were harvested. Evaluation of cell number did not show any significant differences between the various formulations of RSA-PEG microparticles and the PBS-treated rats group, except for a lower cell count observed with rats receiving pegylated microparticles (Fig. 3A). Thioglycollate increased macrophage count. Similar results were observed for LAP activity, another marker of inflammation. While thioglycollate induced a two-fold increase in LAP activity, the various formulations of RSA-PEG microparticles injected, generated lower levels of LAP activities in their respective cell exudates when compared to PBS treated rats (Fig. 3D).

Microparticles induced different responses with respect to phagocytosis. Cell exudates from unmodified, pegylated and lipidated hydrogel microparticle injected rats,

had similar or slightly higher level of phagocytosis activity compared to PBS treated rats, while cell exudates from rats injected with aminated microparticles exhibited a two fold decrease of phagocytosis activity (from 900RFU/mg protein to 400 RFU/mg protein) when compared to those retrieved from rats treated with native microparticles (Fig. 3B). This can be related to the fact that these modified microparticles have a lower value for zeta potential (-11.6 mV) (Table 1) [22]. This is in accordance with the study conducted by Tabata and Ikada [23] showing that 1.0-2.0 $\mu$ m microparticles with high zeta potentials were more readily phagocytosed than those with lower zeta potentials. Phagocytosis activity values of cell exudates originating from native, pegylated and lipidated microparticle injected rats are in agreement with the zeta potentials of these microparticles which were -20, -18 and -14mV, respectively (Table I). Some studies have demonstrated that pegylation of microparticles allowed an efficient protection against phagocytosis [24,25]. Pegylation reduces the zeta potential, increases the microparticle's hydrophilicity and creates a steric barrier against opsonization by serum proteins [26]. However, the protective effect of pegylation is highly dependent on chain length and surface density [27]. Pegylation of RSA-PEG microparticles did not reduce in a significant way the zeta potential (Table 1) and phagocytosis activity (figure 3B) of the cell exudates compared to unmodified microparticles suggesting that the density of PEG at their surface was not high enough to provide an efficient steric barrier to opsonization and phagocytosis.

Elevated levels of non-specific esterase activity, a lysosomal enzyme, have been reported in peritoneal macrophages obtained from rats treated with thioglycollate [16, 28]. When compared to the group treated with PBS, rats treated with various formulations

of RSA-PEG microparticles showed similar levels of non-specific esterase activity, but all of these groups had lower esterase activity (10mU/mg protein) than the group treated with thioglycollate (15mU/mg protein) (Figure 3C). Upon differentiation and activation from monocytes to macrophages, the activity of non-specific esterase increases and becomes resistant to fluoride [16]. For all of groups, levels of NaF resistant esterase activity were similar (1-2mU/mg protein) with the exception of those injected with native and pegylated microparticles which were significantly higher than the PBS-treated group. The percentage of NaF resistant esterase activity was lower in groups treated with PBS and aminated microparticles (15%) than the other groups (20%) (Figure 3C). Overall, results obtained from this series of experiments indicated similar response patterns except for thioglycollate. At the dose of 250mg of microparticles per kg used in this study, microparticles did not show any adverse effect on their host. Furthermore, the surface chemistry of the microparticles was not a major factor that modulated the response when hydrogel microparticles were used.

We also monitored albumin as another marker of inflammation. Acute phase protein levels are known to decrease or increase in the case of inflammation. Miller et al. in 1999 have demonstrated that serum albumin levels in male rats stimulated with turpentine were reduced to 2/3 of the baseline level [9]. Sera pooled from all rats within each group tested with hydrogel microparticles showed no significant differences in the amount of albumin when compared to sera from PBS-treated rats (Data not shown). In contrast, rats treated with thioglycollate, had a 33% decrease from the normal value to 22mg/ml instead of 32mg/ml (Data not shown). Decrease in serum albumin levels was not due to a decrease in total protein synthesis, since total protein from peritoneal cell

exudates was higher for thioglycollate-treated group than for other groups (Data not shown).

### **Effect of multiple injections of native microparticles**

Unmodified microparticles being simpler to prepare were used to evaluate the effect of multiple injections on macrophage activation. The dose of 250mg/kg was used for injection since it was shown to be relatively innocuous. Another series of experiments was undertaken to determine if repeated injections will induce sensitization, which has a direct effect on the magnitude of the inflammatory response. Groups of rats receiving 1, 2 or 3 injections were formed. Rats receiving more than 1 injection were treated on a weekly basis (1 injection/week). Rats injected twice or thrice, generally showed a decrease in the number of cells in their peritoneal exudates compared to those injected once (Figure 4A). This phenomenon was non-specific since all three groups (PBS, microparticles, thioglycollate) showed a similar response. For all groups, phagocytosis was higher after 2 and 3 injections (Figure 4B), while LAP activity increased only after the third injection (Figure 4D). The stronger phagocytosis activity of the cell exudates after the second injection was not accompanied by an increase in cell proliferation (Figures 4A, 4B). As for vaccination, the injection schedule might prove to be an important factor in modulating inflammation. Dams *et al.* reported that on repeated intravenous administrations of long-circulating liposomes, the time clearance of subsequent doses was dependent on the time interval between two injections [29]. Armstrong *et al.* have reported similar results for long-circulating nanoparticles and found that the improved uptake was not mediated by serum complement or due to

proliferation of Kupffer cells in the liver [29]. Macrophages, the main cell type of peritoneal cells might be altered functionally after a first exposure to microparticles and became able to process or phagocyte microparticles quicker upon following injections.

## CONCLUSIONS

Macrophages are the main component of peritoneal cell exudates as demonstrated by flow cytometric analysis with the mAb ED1. With all formulations of, 3 $\mu$ m RSA-PEG microparticles induced no or only slight response from peritoneal macrophages as attested by cell number, LAP activity and albumin level. However, phagocytosis activity was higher in the presence of microparticles compared to PBS used as the negative control. It is reported herein that non-specific esterase activity is not an indicator of choice for peritoneal inflammation. The results from this study showed that the hydrogel microparticles behaved the same as the saline solution most of the time and showed good compatibility *in vivo* when assayed in the rat peritoneum. From this study, it seems that surface chemistry of microparticles does not have a strong influence on their immunogenicity under the same assay conditions.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie, the Fonds de Formation et d'Aide à la Recherche and the Université du Québec à Montréal for their financial support. Our special thanks to Ms Sophie Ouellette (UQAM) for her help with animal manipulations, to Dr Roch Thibert (Merck Frosst Canada, Montreal) for giving us access to the Malvern 2600, to Dr Benoît Marsan (UQAM) for allowing us the use of the Zeta Sizer, to Mr Michel Marion (UQAM) for his help with the FACScan and to Mr Bertrand Fournier (UQAM) for the statistical analysis.

## REFERENCES

- 1- Daems W. Th. and Korten H.K. (1978) The effect of various stimuli on the cellular composition of peritoneal exudates in the mouse. *Cell Tissue Res.* 190, 47-60.
- 2- Williams D.F. (1987) Tissue-biomaterials interactions. *J. Mater. Sci.* **22**, 3421-3444.
- 3- Kawaguchi H., Koiwai N., Ohtsuka Y., Miyamoto M. and Sasakawa S. (1986) Phagocytosis of latex particles by leucocytes: I. Dependence on the size and surface potential of particles. *Biomaterials* **7**, 61-66.
- 4- Freyria A.M., Chignier E., Guidollet J. and Louisot P. (1991) Peritoneal macrophage response: an *in vivo* model for the study of synthetic materials. *Biomaterials* **12**, 111-118.
- 5- Tomazic-Jezic V.J., Merritt K. and Umbreit T.H. (2001) Significance of the type and the size of biomaterial particles on phagocytosis and tissue distribution. *J. Biomed. Mater. Res.* **55**, 523-529.
- 6- Cohn Z.A. (1978) The activation of mononuclear phagocytes: facts, fancy and future. *J. Immunol.* **121**, 813-816.
- 7- Karnovsky M.L. and Ladzinis J.K. (1978) Biochemical criteria for activated macrophages. *J. Immunol.* **121**, 809-813.
- 8- Morahan P.S. and Miller G.A. Ectoenzymes in the expression of mononuclear phagocyte differentiation: mini-review. In *Mononuclear Phagocyte Biology*. Volkman A., Ed. Marcel Dekker, New York, 1984, Chapter 10, p 189-206.
- 9- Miller I., Haynes P., Eberini I., Gemeiner M., Aebersold R. and Gianazza E. (1999) Proteins of rat serum: III. Gender-related differences in protein concentration under baseline conditions and upon experimental inflammation as evaluated by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **20**, 836-845.
- 10- Fortier G. and Laliberté M. (1993) Surface modification of horseradish peroxidase with poly(ethylene glycol)s of various molecular masses. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **17**, 115-130.
- 11- He P., Jean-Francois J. and Fortier G. Poly(ethylene glycol)-albumin hydrogel microparticles for controlled delivery of bioactive agents: Synthesis and *in vitro* characterization. To be submitted.
- 12- Liu Y. and Fortier G. Surface modification of microparticles and evaluation of the stability of loaded enzymes. To be submitted.



- 13- Terstappen L., Meiners H. and Loken M.R. (1989) A rapid sample preparation for flow cytometric analysis of immunofluorescence allowing absolute enumeration of cell subpopulations. *J. Immunol. Methods* **123**, 103-112.
- 14- Ennist D.L. and Jones K.H. (1983) Rapid method for identification of macrophages in suspension by acid alpha-naphthyl acetate esterase activity. *J. Histochem. Cytochem.* **31**, 960-963.
- 15- Damoiseaux J., Döpp E., Calame W., Chao D., MacPherson G. and Dijkstra C. (1994) Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology* **83**, 140-147.
- 16- Sonne O., Pedersen K., Kudahl K. and Fisker S. (1991) A rapid microtitration plate assay for non-specific esterase. *Scand. J. Immunol.* **33**, 231-235.
- 17- Morahan P.S., Edelson P.J. and Gass K. (1980) Changes in macrophages ectoenzymes associated with antitumor activity. *J. Immunol.* **125**, 1312-1317.
- 18- Uff C.R., Pockley A.G. and Phillips R.K.S. (1993) A rapid microplate-based fluometric assay for phagocytosis. *Immunol. Invest.* **22**, 407-413.
- 19- Rodkey F.L. (1965) Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum. *Clin. Chem.* **11**, 478-487.
- 20- Fisker S., Kudahl K. and Sonne O. (1990) Isolation of rat peritoneal mononuclear and polymorphonuclear leucocytes on discontinuing gradients of Nycodenz. *J. Immunol. Methods* **133**, 31-38.
- 21- Johnson W.J., DiMartino M.J. and Hanna N. (1986) Macrophage activation in rat models of inflammation and arthritis: determination of markers and stages of activation. *Cell. Immunol.* **103**, 54-64.
- 22- Jean-Francois J., Liu Y. and Fortier G. Hydrogel microparticles of PEG-albumin : Influence of size and surface nature on its biodistribution in rats. *To be submitted*.
- 23- Tabata Y. and Ikada Y. (1988) Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials* **9**, 356-362.
- 24- Fontana G., Licciardi M., Mansueto S., Schillaci D. and Giammona G. (2001) Amoxicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: Influence of PEG coating on the particle size, drug release rate and phagocytic uptake. *Biomaterials* **22**, 2857-2865.
- 25- Mosqueira V., Legrand P., Gulik A., Bourdon O., Gef R., Labarre D. and Barratt G. (2001) Relationship between complement activation, cellular uptake and surface

- physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials* **22**, 2967-2979.
- 26- Gref R., Domb A., Quellec P., Blunk T., Müller R.H., Verbavatz J.M. and Langer R. (1995) The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **16**, 215-233.
- 27- Jeon S.I., Lee J.H., Andrade J.D., De Gennes P.G. (1991) Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide. I. Simplified theory. *J. Colloid Interf. Sci.* **142**, 149-158.
- 28- Turyna B. and Szuba K. (1988) The comparison of lysosomal enzymes activities in alveolar and peritoneal macrophages of rat. *Biochem. Int.* **17**, 433-440.
- 29- Dams E., Laverman P., Oyen W., Storm G., Scherphof G., Van der Meer J., Corstens F. and Boerman O. (2000) Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **292**, 1070-1079.
- 30- Armstrong T.I., Moghimi S.M., Davis S.S. and Illum L. (1997) Activation of the mononuclear phagocyte system by poloxamine-908: its implication for targeted drug delivery. *Pharm. Res.* **14**, 1629-1633.

## CAPTIONS

### Figure 1:

Flow cytometric analysis of peritoneal macrophages. A) Light scatter profile of rat peritoneal exudates five days after injection of thioglycollate; SSC is an indication of cell granularity and FSC an indication of cell size. B) Cytometric analysis of rat peritoneal exudates retrieved five days after thioglycollate injection and incubated with mAb-ED1-FITC; fluorescence scale is logarithmic.

### Figure 2:

Time-kinetics of various macrophage activation parameters. Groups of 4 rats were injected intraperitoneally with PBS (▤), 250mg/kg of 3 $\mu$ m RSA-PEG microparticles (□) or 250mg/kg of thioglycollate solution (■). Animals were sacrificed at selected days and their peritoneal cavity washed with HBSS. The various figures represent peritoneal macrophage counts (A) phagocytosis activity (B), esterase activity (C) and leucine aminopeptidase activity (D). Each bar is the average of 4 rats. \*Statistically significant difference when compared to PBS-treated group ( $p < 0.0001$ ).

### Figure 3:

Effect of surface chemistry of the microparticles on the activation of macrophages. Groups of 4 rats were injected intraperitoneally with PBS, 250mg/kg of native, aminated, PEGylated or lipidated 3 $\mu$ m RSA-PEG microparticles or 250mg/kg of thioglycollate. Animals were sacrificed 5 days after the injection and their peritoneums were washed with HBSS. The various figures represent peritoneal macrophage counts (A) phagocytosis activity (B), esterase activity (▤) or NaF-resistant esterase activity (□) (C) and leucine aminopeptidase activity (D). Each bar is the average of 4 rats. \*Statistically significant difference ( $p < 0.01$  vs PBS-treated group).

### Figure 4:

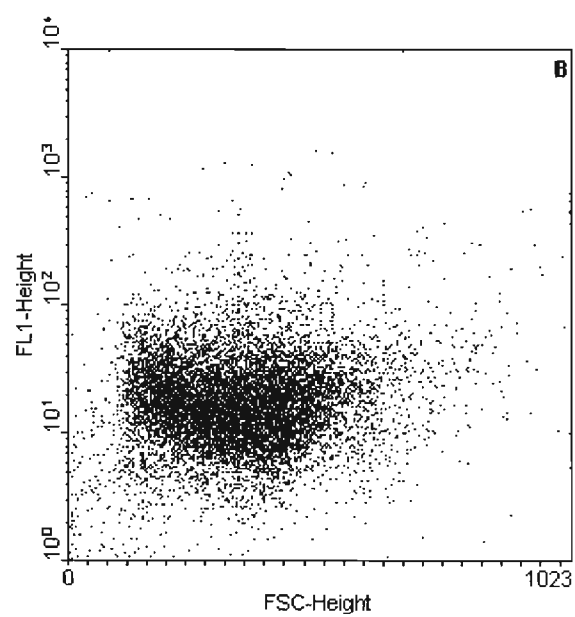
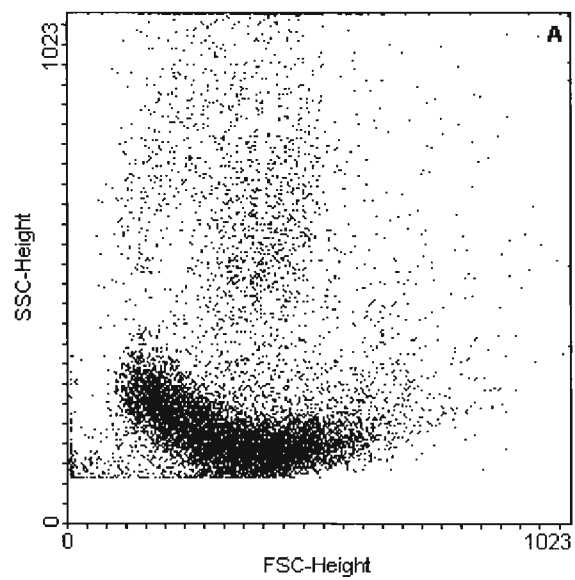
Effect of the number of microparticle injections on the activation of macrophages. Groups of 4 rats were injected intraperitoneally with PBS (▤), 250mg/kg of native 3 $\mu$ m RSA-PEG microparticles (□) or 250mg/kg of thioglycollate (■) on a weekly basis. Animals were sacrificed 5 days after the last injection and their peritoneums were washed with HBSS. The various figures represent peritoneal macrophage counts (A) phagocytosis activity (B), esterase activity (C) and leucine aminopeptidase activity (D). Each bar is the average of 4 rats. \*Statistically significant difference when compared to PBS-treated group ( $p < 0.0001$ ).

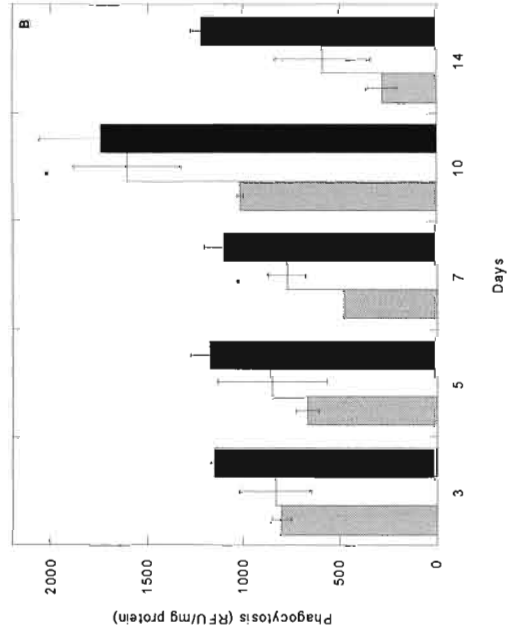
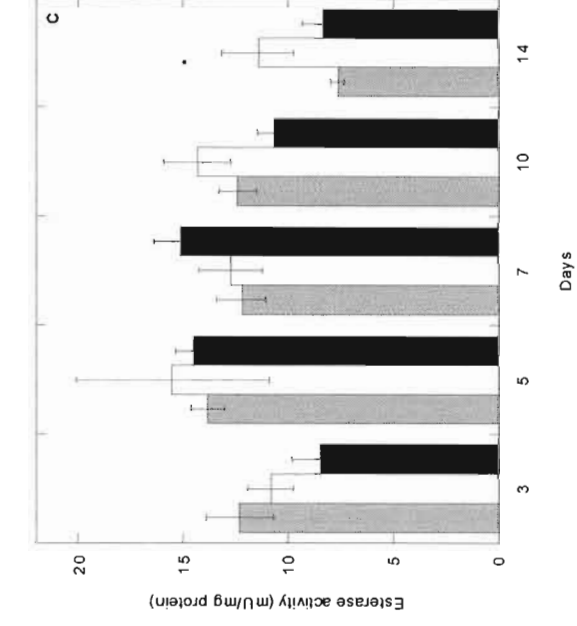
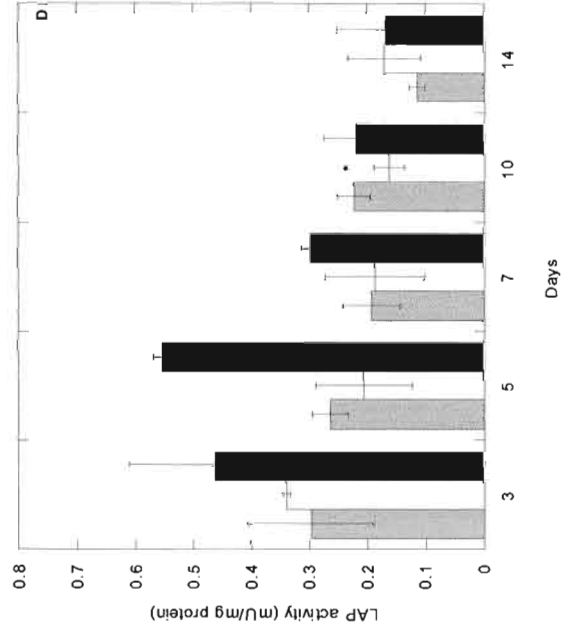
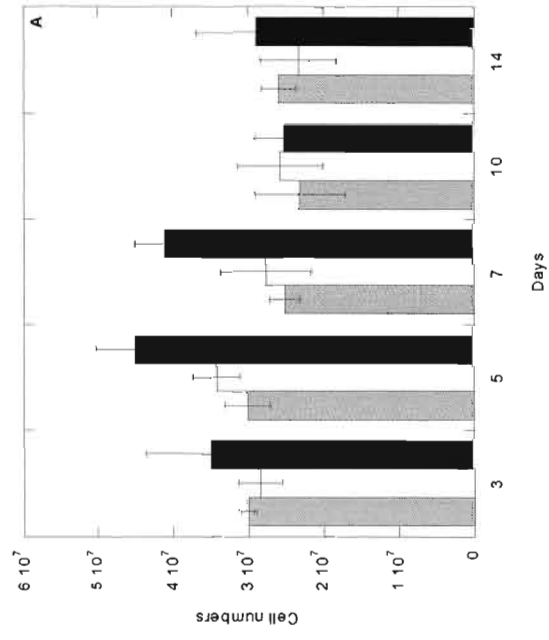
**Table I**

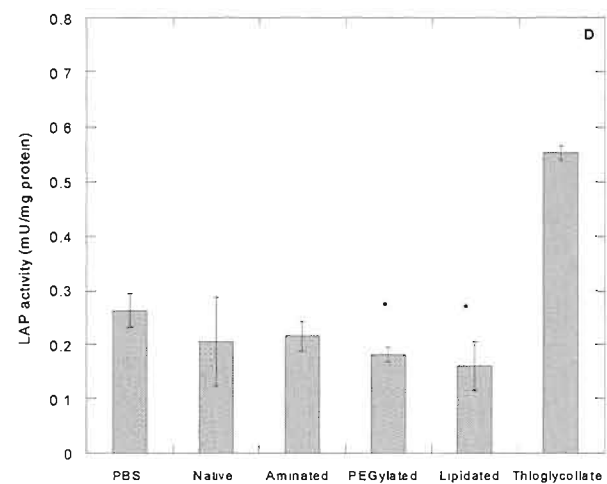
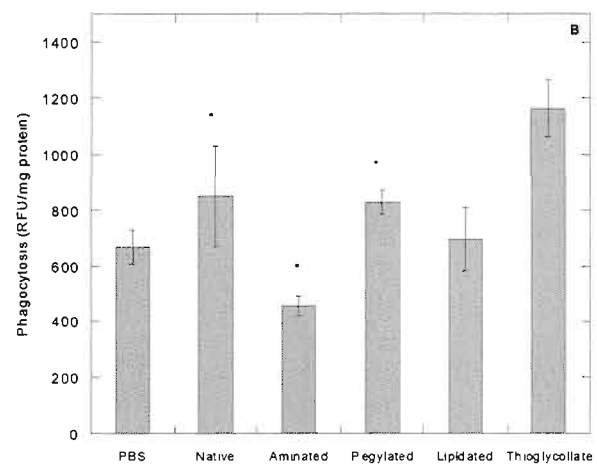
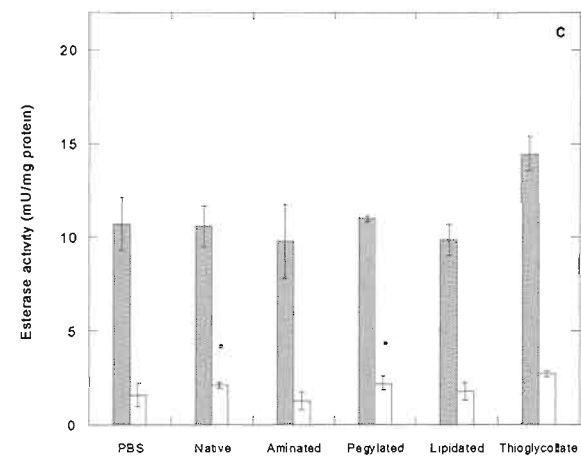
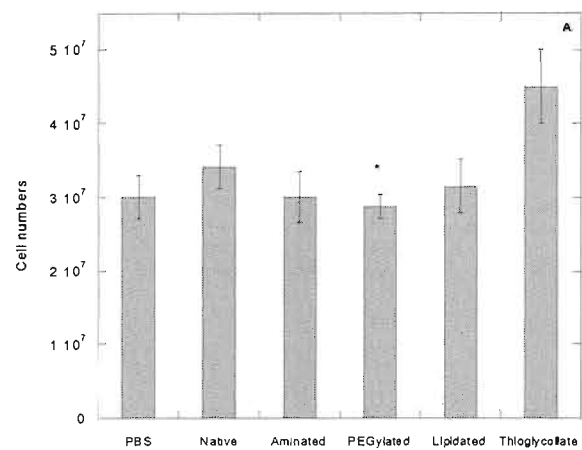
Physical characteristics of RSA-PEG microparticles

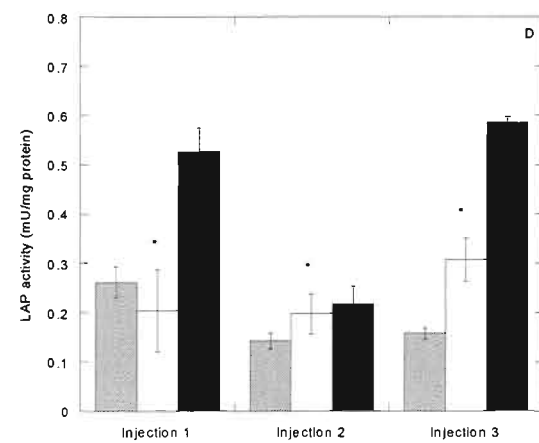
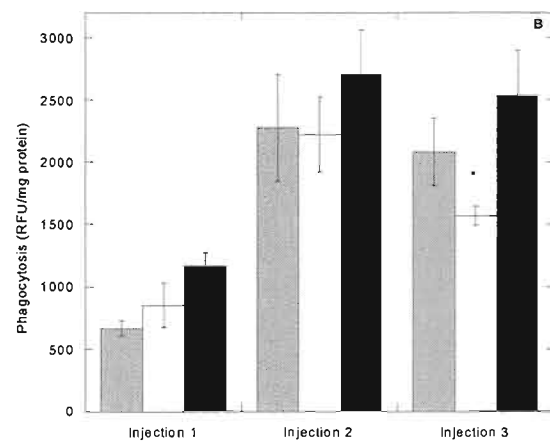
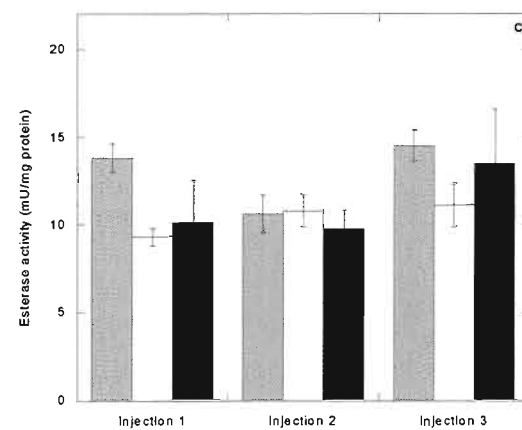
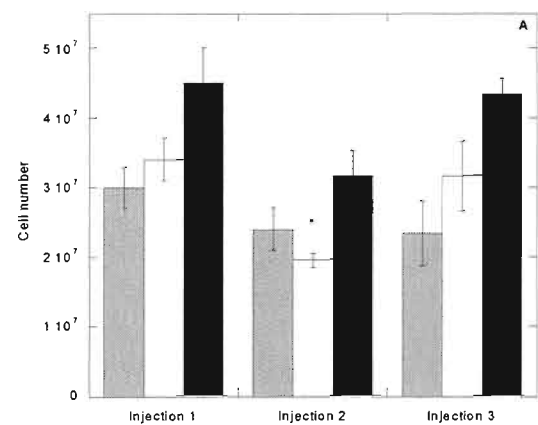
Microparticle	Size ( $\mu\text{m}$ )	Span	Zeta potential (mV)
Native	$3.28 \pm 0.10$	$0.52 \pm 0.06$	$-20.50 \pm 1.00$
Aminated	$3.30 \pm 0.03$	$0.54 \pm 0.03$	$-11.32 \pm 1.00$
PEGylated	$3.20 \pm 0.05$	$0.70 \pm 0.04$	$-18.52 \pm 2.04$
Lipidated	$4.30 \pm 0.55$	$1.02 \pm 0.10$	$-14.30 \pm 1.75$

Synthesis was carried out at room temperature, using PEG of 2000 Da of molecular mass. The rotation of the propeller was set at 4000rpm. Concentration of reagents and procedure were similar to those described in Materials and Methods. All measurements were performed in triplicate.











## **Instillation pulmonaire de microparticules d'hydrogel de RSA-PEG chez le rat normal et diabétique.**

J. Jean-François and G. Fortier

Laboratoire d'enzymologie appliquée

Département de chimie-biochimie, Université du Québec à Montréal

C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montréal (Québec) Canada H3C3P8

Des microparticules de PEG-albumine, de 3 $\mu$ m de diamètre, obtenues par une émulsion eau dans huile ont été administrées par voie intratrachéale à des rats mâles Sprague-Dawley. Les études de biodistribution ont montré l'accumulation la plus élevée de ces microparticules dans le poumon gauche (84nCi/g de tissu) et la plus faible accumulation dans le lobe supérieur du poumon droit (5nCi/g de tissu). Les rats sains traités avec une instillation intratrachéale unique de 40mg/rat de microparticules de PEG-albumine ne montrèrent aucune augmentation significative des marqueurs de l'inflammation pulmonaire, exception faite de la phagocytose, lorsque comparés avec le groupe de rats recevant une solution saline. Pour ces deux groupes les marqueurs de l'inflammation pulmonaire étaient significativement inférieurs à ceux des rats traités avec du lipopolysaccharide (LPS). Les études *in vitro* de libération de l'insuline démontrèrent que l'insuline associée aux microparticules atteint une libération maximale après 10 minutes. La proportion d'insuline associée aux microparticules atteint 20%. Des microparticules chargées d'insuline (5.4IU) et administrées par voie intratrachéale à des rats diabétiques ont diminué de 80% la glycémie initiale. L'effet hypoglycémiant durait plus longtemps que celui induit par une instillation intratrachéale ou une injection sous-cutanée d'insuline libre (5.4IU). La glycémie des rats sains et diabétiques soumis à un jeûne et instillés intratrachéalement avec une solution saline ou des microparticules vides a diminué de 30% en l'espace de deux heures. Les lavages bronchoalvéolaires des poumons de rats diabétiques ont montré une augmentation significative de l'activité LDH et du nombre de cellules lorsque comparés aux rats sains. Cependant l'activité phagocytaire des macrophages alvéolaires chez les rats diabétiques était significativement augmentée par rapport à celle des macrophages alvéolaires des rats sains.

## **Instillation of RSA-PEG hydrogel microparticles in lungs of normal and diabetic rats.**

**J. Jean-François and G. Fortier**

Laboratoire d'enzymologie appliquée  
Département de chimie-biochimie, Université du Québec à Montréal  
C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montréal (Québec) Canada H3C3P8

**Keywords:** Macrophages, rat, lung, microparticle, hydrogel, rat serum albumin, poly(ethylene glycol), cellular response, biodistribution, alkaline phosphatase, insulin, diabetes.

**Short running title :** Intrapulmonary administration of RSA-PEG microparticles.

\*to whom correspondence should be sent

Dr G. Fortier  
Laboratoire Enzymologie Appliquée  
Dép. Chimie-Biochimie  
Université du Québec à Montréal  
C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal (Québec),  
Canada H3C3P8  
Tel : 514-987-3000 ext.4455  
Fax : 514-987-4054  
fortier.guy@uqam.ca

## ABSTRACT

Male Sprague-Dawley rats were instilled intratracheally in a supine position with 3 $\mu$ m RSA-PEG radiolabeled microparticles prepared by an emulsion of water in oil. Biodistribution studies showed the highest accumulation in the left lung (84nCi/g tissue) and the lowest accumulation in the upper lobe of the right lung (5nCi/g tissue). Single intratracheal instillation of healthy rats with 40mg of microparticle/rat showed no significant increase in pulmonary inflammatory markers when compared to rats treated with saline, except for phagocytosis. Pulmonary inflammatory markers for both groups (microparticle-treated and saline solution-treated) were significantly lower than the lipopolysaccharid (LPS)- treated group. *In vitro* release showed that insulin associated with microparticles reached a maximal release after 10 minutes. Insulin-loaded microparticles (5.4 IU) intracheally instilled in diabetic rats induced a maximal decrease of 80% in their level of glycemia. The hypoglycemic effect lasted longer than that observed in rats treated with 5.4IU of insulin given by intratracheal instillation. Fasting healthy and diabetic rats, intratracheally instilled with saline or empty microparticles, showed a 30% from the initial level of glycemia within 2 hours. Bronchoalveolar washes from the lungs showed significant increases in LDH activity and cell numbers in diabetic rats when compared to healthy rats; phagocytosis was also significantly increased in the diabetic rats in comparison to healthy rats.

## INTRODUCTION

Pulmonary delivery of therapeutic peptides and proteins is a rapidly growing area in pharmaceutical science [1]. Because of their large size and susceptibility to proteolytic degradation in the gastrointestinal tract, proteins are usually administered by injection instead of per os. Peptides and proteins when injected by I.V. show some inconvenient such as their rapid clearance from the circulation, therefore frequent injections are required to maintain therapeutic level. This leads to a poor patient compliance to the treatment [2]. Pulmonary administration of proteins by inhalation offers an attractive and noninvasive alternative to I.V. injection. Lungs have a large absorption surface and are rather tolerant to foreign substances. They present a better permeability to peptides and proteins than the gastrointestinal tract or the nasal mucosa. They also contain protease inhibitors which can prevent the proteolytic breakdown of peptides and proteins [3, 4]. There are other advantages such as rapid absorption of the drug into the bloodstream, bypass of the hepatic first-pass elimination and lack of requirement of penetration enhancer agent thus simplifying the toxicological issues [5]. The systemic absorption of molecules from the lung was extensively studied in animals by Schanker et al. and the lung was shown to be more permeable to both low and high molecular weight molecules than the gastrointestinal tract [6, 7]. Macromolecules with sizes ranging from 6kDa (insulin) to 22kDa (granulocyte colony stimulating factor) have shown bioavailabilities ranging between 100 and 50%, when compared to bioavailability observed with subcutaneous injection [8, 9].

Despite the milder environment in the lung, when compared to the gastrointestinal tract, it presents nevertheless a number of barriers which might affect the efficiency of therapeutic proteins and peptides. The mucus, a complex mixture of lipids and glycoproteins, is the first barrier that a drug will encounter after deposition in the lungs. This protective layer has been shown, *in vitro*, to slow down significantly the diffusion of small molecules [10] and, *in vivo*, it can induce the aggregation of proteins and hydrophobic microparticles. These aggregates are usually cleared from the airways by the mucociliary tract [3]. The second barrier is associated with the macrophages and is perhaps the most influential one. The macrophage is a normal resident of the airways and its main task is to clear all foreign substances from the lung. These cells can ingest very rapidly a particulate burden or soluble macromolecules [11, 12]. Under inflammatory conditions, macrophages are able to secrete a wide array of molecules such as peroxides [13] or proteases [14], creating a hostile environment for any inhaled therapeutic. Finally, therapeutic peptides and proteins are exposed to a metabolic barrier which is ubiquitous in the lungs: peptide hydrolases. These proteases are present in extracellular secretions, intracellularly or membrane bound to most cell types and they cleave peptides and proteins in a non-specific way [3].

Carrier systems such as nano- or microparticles or liposomes can be useful to allow protection of labile peptides or proteins against inactivation and for targeting the deep airways to maximize absorption of a therapeutic. Such a carrier system increases the residence time of a drug in the airways, by controlling its release and extending its duration in the bloodstream. It also reduces dosage frequency, resulting in an increase in patient compliancy [15, 16]. Few studies have been performed on the pulmonary delivery

of peptides and proteins using a carrier system. Most studies showed a marked improvement in the pharmacokinetics and therapeutic efficiency in comparison to the free drug [16-18]. A liposomal formulation of interleukin-2 has demonstrated no systemic toxicity in man when used to cure pulmonary metastases while free interleukin-2 induced adverse and toxic systemic effects [17]. Insulin associated with carrier systems has shown a sustained hypoglycemic effect when compared to free insulin, as reported by Kawashima et al. with 400nm PLGA nanoparticles [18] and Edwards et al. with large porous 10 $\mu$ m PLGA microparticles [16] .

Insulin is one of the most commonly used therapeutic peptides and proteins and it is used to treat types I and II diabetes, a leading cause of death and associated illnesses (blindness, renal complications) in the world. There is a great deal of pressure to find a cure for these diseases and to date, insulin still remains the most reliable treatment. A good understanding of the pathology also requires a good animal model to validate any therapeutic strategy. Induction of diabetes in small animals by pancreatectomy or by administration of drugs such as alloxan or streptozotocin are more convenient approaches rather than waiting for spontaneous development of the disease [19]. The streptozotocin-induced diabetic rat is the most widely used animal model since its description in the 1960s to study acute metabolic and long term complications of diabetes. Streptozotocin is an antibiotic which depletes NAD<sup>+</sup> in pancreatic  $\beta$ -cells, causing cell degranulation and leading to necrosis [20]. Administration of this antibiotic induces diabetes in pigs, dogs, cats, monkeys, rabbits, hamsters, guinea pigs, mice and rats in a predictable and reproducible way [21].

The aim of the present work was to evaluate the pulmonary biodistribution and biocompatibility of RSA-PEG hydrogel microparticles in the rat using intratracheal instillation. Although this method has been qualified sometimes as being non clinically applicable, it offers a convenient and valid way to deliver foreign compounds to the airways in small animals [22]. In the second part of this paper, the insulin-loaded RSA-PEG hydrogel microparticles were evaluated in streptozotocin-induced diabetic rats in terms of their hypoglycemic effect.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **MATERIALS**

Rat serum albumin (RSA), bovine insulin, lactate dehydrogenase (LDH) kit assay, Fast Red RC salt, a-naphtyl acetate, sodium fluoride, lipolysaccharide E. coli serotype 055:B5 (LPS), streptozotocin, polyethylene glycol of molecular weight 2kDa, methoxypolyethylene glycol of molecular weight 5kDa, cottonseed oil, chloramine T and sodium metabisulfite were all purchased from Sigma (St Louis, USA). 4-nitrophenylphosphate was purchased from Boehringer Mannheim (Laval, Canada) Minimal essential medium (MEM) was purchased from Gibco BRL (Rockville, MD, USA). Na<sup>125</sup>I was purchased from ICN (Costa Mesa, USA). Triton was purchased from Fluka MG (Germany). Foetal calf serum (FCS) was purchased from Medicorp (Montreal, Canada). 2.03µm dyed fluorescent microspheres were purchased from Bangs Laboratories (Fishers, IN, USA). Male Sprague-Dawley rats (200-250g) were obtained from Charles Rivers (St-Constant, Canada).

## **METHODS**

### **Activation of PEG**

The activation of PEG (M.W. 2kDa) or methoxypoly(ethylene glycol) (mPEG) (M.W. 5kDa) was performed with 4-nitrophenyl chloroformate according to a published procedure [23]. The resulting di-p-nitrophenylcarbonate PEG and p-nitrophenyl carbonate m-PEG were stored at -20°C.

### **Synthesis of microparticles**

Microparticle synthesis was carried out as described before in a thermostated beaker containing 240ml of cottonseed oil under stirring (4000rpm) provided by a Cole-Parmer(r) Servodyne electronic mixer [24]. It consists of a bolus injection of 500µl of aqueous reagents containing 1 part of 100mg/ml RSA in 400mM borate buffer pH 9.4 and 1 part of activated bifunctional PEG 2K at 270mg/ml in water. The speed of the propeller was gradually decreased to 1500 rpm during a 6 hour period. At this time, the reaction was stopped. Fifty ml of pentane were added to the beaker and the mixture was centrifuged at 10,000 rpm in an IEC B-204 centrifuge for 10min. The sedimented microparticles were washed 3 times in Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4 (137mM NaCl, 5mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) and stored at 4°C until further use. The size of the microparticles was evaluated.

### **Characterization of microparticles**

#### **Size measurement**

Size measurements of hydrogel microparticles were performed on a Malvern 2600 Series particle size analyzer by light diffraction. The light source was provided by a



helium-neon laser. Briefly, a volume of microparticles was diluted in a cuvette containing 25ml of PBS to obtain before measurement an obscuration of 0.021. The sample was then measured and particle mean diameter and span were calculated by the software "Operating System SB.OB". The span, which evaluated the width of the volume distribution relative to the median diameter, was defined as:

$$\text{Span} = (D90\% - D10\%) / D50\% \quad \text{DX\% is the diameter at a fixed percentage point.}$$

### **Preparation of radioactive labeled microparticles**

To 2-3g of hydrated native or surface modified microparticles suspended in 5ml of PBS containing 0.1% Triton X-100, pH 7.4, were added 2 $\mu$ l of Na<sup>125</sup>I (200 $\mu$ Ci) followed by 0.5ml of chloramine T (3.6mg/ml). The suspension was mixed gently for 2 minutes. The reaction was stopped by adding 0.5ml of sodium metabisulfite (10mg/ml) under gentle stirring for 2 minutes. The radioactive microparticles were transferred to a dialysis bag (M.W. cut off 12000-14000Da) and dialyzed overnight against PBS, pH 7.4 to eliminate unbound reagents. The washing medium was changed three times. Prior to injection in a rat, the suspension of microparticles was filtered on a polycarbonate filter with 5 $\mu$ m size pore to avoid possible aggregates (AMD, Mississauga, Canada).

### ***In vitro* release of insulin**

In vitro release of free insulin and insulin associated with microparticles was studied in a two-chamber system in PBS, pH 7.4. The system was made of a multiwell Transwell plate (Costar, USA) with 24mm diameter well (lower chamber) and inserts with a pore size of 0.4 $\mu$ m (upper chamber). Chambers were filled with PBS and were connected by plastic tubing to a peristaltic pump and a diode array spectrophotometer. The total volume of the release medium was 12ml and the flow rate was adjusted to

1.5ml/min. The assay was started by adding 1ml of a 2mg/ml insulin solution or 1ml of insulin-loaded microparticles in PBS in the upper chamber. The release of insulin was followed at 274nm for 10-15 minutes.

### **Intratracheal instillation**

Male Sprague Dawley rats of 280 to 300g were first tranquilized with 50mg/kg of ketamine and then anesthetized with a mixture of isoflurane/O<sub>2</sub> (20:80) at a flow rate of 3-5ml/min. Once anesthetized, the animal was placed in a supine position on a board, tilted at an angle of 45°. The animal was positioned in such a way that his head was on the upper limit of the board and proper extension of the neck was achieved by positioning rolled gauzes underneath the rat's shoulder blades. The superior maxilla was pulled up by an elastic band. Transillumination of the thorax by a laryngoscope allowed the installation of the endotracheal tube. The endotracheal tube was a flexible Angiocath 18 gauge intravenous catheter made of plastic (Becton Dickinson, USA) [25]. The endotracheal tube was connected to a 1ml syringe to deliver the suspension of radioactive or insulin-loaded microparticles into the rat lung.

### **Pulmonary biodistribution**

Male Sprague-Dawley rats (280-300g) were instilled with 200µl (278nCi/rat) of radioactive microparticles in sterile PBS, pH 7.4. One hour after the injection, animals were euthanasized by a mixture of O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> and the lung was isolated to evaluate the radioactivity. Each pulmonary lobe was weighed and then cut into small pieces with scissors and put in a test tube. Radioactivity in the different pulmonary lobes was read directly on a 1282 Compu Gamma CS gamma counter (Pharmacia, Finland). In another

experiment, the lobes were deposited on a X-ray film to evaluate the radioactivity distribution pattern inside the lobes.

### **Analysis of bronchoalveolar content**

Rats were euthanasized with O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, placed on a tilted board and an incision was made to expose the trachea. The latter was cannulated with a plastic and flexible Angiocath 18 gauge intravenous catheter tubing. The lungs were washed 6 times with 5ml of Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) pH 7.4 (0.5mM KCl, 0.04mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.08mM MgSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 13.6mM NaCl, 2.6mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.03mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.006mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5mM glucose). A total volume of 25-27ml was collected from each rat and centrifuged at 800 x g for 10 minutes at 4°C in an IEC Centra-7R centrifuge. The supernatant from the first wash was saved for analysis of alkaline phosphatase and LDH activities. Supernatants from other washes were discarded and the cell pellets were combined as the bronchoalveolar cells. The cell pellets were suspended in 0.2ml HBSS to evaluate viability and phagocytosis activity [26].

### **Pulmonary biocompatibility**

Male Sprague-Dawley rats (280-300g) were intratracheally instilled with 200µl of sterile PBS, 200µl LPS 3.2mg/ml or 200µl (40mg/rat) of RSA-PEG microparticles. The animals were euthanasized 7 days later using a mixture of O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, and a bronchoalveolar content analysis was performed to evaluate cell numbers and to analyze LDH and alkaline phosphatase activities.

### **Induction of diabetes**

Healthy male Sprague Dawley rats (280-300g) were tranquilized with 50mg/kg of ketamine and anesthetized with a mixture of isoflurane/O<sub>2</sub> before being injected intravenously in the jugular vein with 110mg/kg of streptozotocin in citrate buffer 0.1M, pH 4.0. Rats were supplied with a 20% glucose solution to avoid glucose depletion. Glycemia was monitored with an Accu-Chek Compact glucometer (Roche, Canada). Rats showing a glucose concentration superior to 22mM (400mg/dl) after 24h were considered diabetic; the dextrose solution was removed and replaced by water [19].

### **Intratracheal delivery of insulin-loaded microparticles**

Male Sprague Dawley rats (280-300g) used in this experiment were divided into 6 groups. Group 1 was made of healthy rats and instilled with 200µl of saline solution. Group 2 was made of diabetic rats and instilled with 200µl of saline solution. Group 3 was made of diabetic rats and instilled with 200µl of RSA-PEG insulin-free microparticles. Group 4 was made of diabetic rats and instilled with 200µl of RSA-PEG insulin-loaded 5.4IU microparticles. Insulin loading of the microparticles was achieved by incubation of 200mg of microparticles in 1ml of a 2mg/ml insulin solution for 24 hours. Group 5 was made of diabetic rats and instilled with 200µl of a 2mg/ml insulin solution (5.4IU). Group 6 was made of diabetic rats and injected subcutaneously with 200µl of a 2mg/ml insulin solution (5.4IU). Only groups 1 to 5 were anesthetized and intratracheally instilled. Glycemia was periodically monitored over an 8 h period with an Accu-Chek Compact glucometer (10 A.M.-6 P.M.) during which the rats had access only to water.

## **Biochemical studies**

### **Alkaline phosphatase assay**

The activity of the enzyme was determined in 1M Tris-HCl, pH 8.0, at room temperature with p-nitrophenyl phosphate as a substrate. The release of p-nitrophenol, the end-product of the enzymatic hydrolysis, was followed at 405nm [27]. 100 $\mu$ L of the supernatant phase from the first aliquot of the bronchoalveolar wash were added into a 96-well microplate. Nitrophenyl phosphate was added to a final concentration of 10mM to start the reaction. Each sample was performed in triplicata. The absorbance increase was monitored for 10 minutes at 1 minute intervals on an iEMS spectrophotometer. Sample activities were calculated from initial rates and with an  $\epsilon$  of 15,620M<sup>-1</sup>/cm.

### **Lactate dehydrogenase assay**

LDH activity was measured by using the Sigma diagnostics LDH reagent kit assay [28]. This procedure monitored the decrease of absorbance at 340nm related to the conversion of NADH to NAD<sup>+</sup>. Briefly, 2.85ml of potassium phosphate buffer 0.1M, pH 7.5, and 0.2ml of the acellular part of the bronchoalveolar wash were mixed in a vial containing 0.2mg of NADH. The mixture was incubated at room temperature for 20 minutes. Then, 0.1ml of pyruvate 22.7mM were added and the decrease in absorbance was monitored at 340nm for 3 minutes at 30 second intervals in a Hewlett Packard diode array spectrophotometer, model 8452A. Sample activities were calculated from initial rates and with an  $\epsilon$  of 5,900M<sup>-1</sup>/cm.

### **Phagocytosis assay**

The assay was adapted from Uff et al. [29]. Peritoneal cells in MEM containing 10% of FCS were seeded at a concentration of  $10^5$  cells/well into the multiwell plate and incubated at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub> for 2h to allow cells to adhere. The plate was washed twice with MEM to remove non-adherent cells. Ten microliters of a suspension of  $10^7$  fluorescent microspheres per ml (Bang Lab) were added to each well and the plate was incubated for 90 min to allow phagocytosis of the beads. Following incubation, the plate was washed 3 times with PBS. Cells were solubilized by adding 150µl of a 25mM Tris-HCl buffer solution, pH 8.5, containing 0.2% (w/v) of SDS and the relative fluorescence of each well at an emission wavelength of 520nm was determined using an excitation wavelength of 480nm. Phagocytosis was expressed as the amount of fluorescence retrieved per amount of protein per well, determined by the BCA assay.

### **Data analysis**

Statistical analysis was performed with the software Graph Pad In Stat. Data from different groups were analyzed by ANOVA with the Turkey-Kramer test for multiple comparisons.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Intrapulmonar biodistribution of radiolabeled microparticles**

As previously reported, RSA-PEG hydrogel microparticles synthesized by a "water in oil" emulsion procedure under stirring at 4000rpm produced microparticles with a

mean diameter of  $3\mu\text{m}$  and a low polydispersity [24, 30]. Previous work by Edwards *et al.* have shown that optimal deposition in the deep regions of the lung is obtained when the particles have a size of  $3\mu\text{m}$  [16]. Based on this result, the  $3\mu\text{m}$  RSA-PEG microparticles used in our study should be well suited for pulmonary administration.

The first part of this study was to evaluate the pulmonary biodistribution of RSA-PEG hydrogel microparticles in healthy rats. The method chosen was intratracheal instillation, a valid method for precise and reproducible intrapulmonary administration.

Intratracheal instillation of rats in a supine position with radioactive  $3\mu\text{m}$  RSA-PEG microparticles showed a non-uniform distribution between the different pulmonary lobes (Figure 1). This is in agreement with pulmonary biodistribution results previously reported for colloid particles [31] and liposomes [32]. In the rat, the left lung consists of a single large lobe, while the right lung is made up of four separate lobes, namely the upper lobe, the middle lobe, the lower lobe and the cardiac lobe. Our lung biodistribution studies showed a higher specific activity in the left lobe of  $84\text{nCi/g}$  of tissue. The upper lobe of the right lung showed the lowest activity of all the lobes with a specific activity of only  $5\text{nCi/g}$  of tissue. Exposure of the lungs to an X-ray film for 30 min showed a fairly uniform pattern distribution in each lobe of the radioactivity (results not shown). In contrast, in a previous study, liposome encapsulated-glutathione with a diameter of  $195\text{nm}$  showed the highest distribution in the upper lobe [33]. Since particle size and gravitational position matters during intratracheal instillation, these might explain the differences with our study. The rats in our study were tilted at a  $45^\circ$  angle for intratracheal instillation while in the liposome study, the instillation was carried out with the rats lying on their back.

The size of the RSA-PEG microparticles used in this study should prevent them from translocating to neighbouring tissues like the blood or the liver, as has been observed with hamsters instilled with radioactive 80nm size particles of denatured albumin [34]. Indeed, non-reperfused livers retrieved from the rats herein showed very low activity (0.07nCi/g tissue) which suggested that after 1h, the bulk of the instilled microparticles was located in the lungs (Data not shown).

### **Short-term pulmonary biocompatibility of microparticles**

Prior to any therapeutic application, the safety of the RSA-PEG hydrogel microparticles has to be addressed. A hydrogel is by definition a biocompatible material because of its high water content. A short-term study was thus conducted to evaluate the lung response to the hydrogel microparticles by measuring markers of pulmonary inflammation in the bronchoalveolar washes of treated animals. These markers are an increase in the total cell numbers (macrophages, neutrophils, lymphocytes), an increase in alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase activities and a higher phagocytic activity of isolated alveolar macrophages [26]. One group of rats was instilled with 40mg of microparticles (133mg/kg) per animal. This dose was chosen as maximal because of the limited volume that can be administered to the lungs. The negative control group was instilled with saline solution while the positive control group was instilled with LPS which is known to induce chronic pulmonary inflammation in the rat.

The rats instilled with 40mg of microparticles (133mg/kg) showed levels of pulmonary markers of inflammation similar to rats receiving saline (Table 1). No significant differences were observed for cell numbers, alkaline phosphatase and LDH activities except for the phagocytic activity. Alveolar macrophages isolated from rats



treated with microparticles showed a significantly lower rate of phagocytosis of latex beads *in vitro* when compared to rats treated with saline solution. It seems that alveolar macrophages located in the rat lungs were able to phagocytose the instilled dose of 3µm RSA-PEG microparticles without eliciting any strong inflammatory response, as illustrated by the absence of cell infiltration and the absence of vascular and epithelial damage to the lung, assessed by the activities of LDH and alkaline phosphatase, respectively. However, the intracellular digestion of the phagocytosed RSA-PEG microparticles might not be over by the time the alveolar macrophages are isolated. The presence of undigested RSA-PEG microparticles results in the saturation of the alveolar macrophages and a lower rate of phagocytosis of latex beads *in vitro* (Table 1).

The absence of an inflammatory response in the microparticle treated rats derived from the nature of the RSA-PEG microparticles. They are hydrogels with a high equilibrium water content of 95-96% [35]. They are mostly made of water meaning that at best, 1.6mg of dry material (5mg/kg) were instilled in the rat lungs when each animal was administered 40 mg of humid microparticles. These hydrogel microparticles were made also of biocompatible macromolecules such as PEG, a non-immunogenic polymer, and rat serum albumin which were unlikely to induce adverse effects in a healthy animal.

For comparison purposes, the dose of microparticles used in this series of instillation experiments was in the range of those used in toxicological studies of the lung (1 to 6mg of dry material/kg of animal). Such studies have evaluated the pulmonary response to airborne particles such as silicate particles and β-glucans particles administered by intratracheal instillation. Silicate particles elicited an activation of the

alveolar macrophages followed by a dramatic inflammatory response [26] while  $\beta$ -glucans particles induced an acute pulmonary inflammation [36].

### ***In vitro* behaviour of free and microparticle-associated insulin**

Controlled release systems are advantageous because they provide a delayed release of the active agent or drug. This phenomenon happens because of the specific interactions between the drug and the polymeric matrix and the time needed by the drug to diffuse out of that matrix. Although release studies *in vitro* are not a clear indication of what might happen *in vivo*, they provide useful information about the characteristics of the free and microparticle-associated drug.

Insulin solution (5.4IU) was used as a blank to evaluate the time needed to equilibrate the system. After 200s the free solution of insulin showed no significant increase in absorbance at 274nm and has reached equilibrium (Figure 2). The insulin associated with the RSA-PEG microspheres reached an equilibrium after a longer time of 600s (Figure 2). The insulin release from the 3  $\mu$ m microparticles was characteristically fast because of their small size and high surface exchange area. The fraction of loaded active agent released from a sphere is inversely proportional to the square root of the sphere's radius [37]. Previous studies in our laboratory have corroborated these results. Increasing the size of the microspheres by using PEG of higher molecular weight delayed the diffusion of loaded macromolecules from albumin-PEG microspheres [38].

Insulin release from the 3 $\mu$ m RSA-PEG microparticles was faster than insulin release from nanoparticles made of poly(butyl cyanoacrylate) [15] and Eudragit L100 [37] where insulin release lasted 20 hours and 3 hours, respectively. Different degrees of

hydration and the technique used for insulin incorporation, rather than size, might account for these differences. Fully hydrated RSA-PEG microparticles are made of 96% water and are able to solubilize the insulin; when these insulin-loaded microparticles are in non-equilibrium conditions (insulin free medium), the insulin will diffuse quickly out of the particle without need of further hydration. Insulin-loaded poly(butyl cyanoacrylate) and Eudragit L100 particles were prepared by direct incorporation of the peptide in the synthesis mixture with an association ratio of 80%. Insulin-loaded RSA-PEG particles were obtained by incubation of preformed particles in an insulin solution with a lower association ratio of 20%.

### **Glycemia control in diabetic rats**

Subsequently, glycemia control by insulin-loaded RSA-PEG microparticles was evaluated in diabetic rats. Appropriate groups were designed to take into account the various factors that might affect the performance in vivo of the insulin-loaded microparticles. Group 1 consisted of healthy rats instilled with 200 $\mu$ l of saline solution. Group 2 consisted of diabetic rats instilled with 200 $\mu$ l of saline solution. Group 3 consisted of diabetic rats instilled with 200 $\mu$ l of RSA-PEG insulin-free microparticles. Group 4 consisted of diabetic rats instilled with 200 $\mu$ l of RSA-PEG insulin-loaded 5.4IU microparticles. Group 5 consisted of diabetic rats instilled with 200 $\mu$ l of a 2mg/ml insulin solution (5.4IU). Group 6 consisted of diabetic rats injected subcutaneously with 200 $\mu$ l of a 2mg/ml insulin solution (5.4IU). The chosen parameters were the hypoglycemic effects of the insulin-free microparticles matrix, the invasive effect of intratracheal instillation and the influence of the weaker physiological status induced by diabetes. The dose of

insulin used in this series of experiments (5.4IU) was evaluated as a solution in healthy rats and was able to induce a transient and noticeable hypoglycemic effect without any severe hypoglycemia.

All diabetic animals (Groups 2 to 6) showed elevated glycemia between 25-27mM glucose at the start of the experiment in the morning (10 A.M.). The healthy animals (Group 1) had a normal level of glycemia of 7-8mM glucose. Groups 1 to 5 were instilled intratracheally with various formulations and their level of glycemia was monitored for 8 hours; during this period the animals had access only to water (Figure 3). Groups 1 (healthy rats) and 2 (diabetic rats) were instilled with a saline solution and showed a decrease in their of glycemia in the first two hours of the experiment before it stabilized at around 70% of the initial level of glycemia throughout the rest of the experiment. Group 3 (diabetic rats) was instilled with empty microparticles and showed a similar pattern to groups 1 and 2; this result was not surprising since microparticles were made of 96% of water. The decrease in the level of glycemia in Groups 1 to 3 was attributed to the lack of food intake. Group 5 (diabetic rats), instilled intratracheally with 5.4 IU of insulin and Group 6 (diabetic rats) injected subcutaneously with 5.4 IU of insulin showed a residual level of glycemia of 20% and 30% of initial levels, respectively. The decrease in the level of glycemia for Group 6 was faster than for Group 5; 60 minutes after treatment, the level of glycemia of Group 6 was reduced to 20% of the initial level compared to 40% for Group 5. Although the total decreases were similar for both groups, the more rapid decrease in the level of glycemia in Group 6 reflects a quicker absorption phase of the insulin by the subcutaneous route [2]. The most striking result was reported for Group 4, made of diabetic rats administered intratracheally with 5.4 IU of insulin-loaded

microparticles. In the first two hours, the decrease in the level of glycemia was similar to Group 5. The lowest value reached by Group 4 was 20% of the initial level of glycemia and more important, it stayed at that value for the remainder of the experiment. However, the glycemia value returned to its initial value ( $> 20\text{mM}$  glucose) the following morning. In comparison, following the initial decrease in the level of glycemia in Groups 5 and 6, there was an increase in blood glucose concentration three hours after treatment, reaching 60% to 70% of the initial level of glycemia at the end of the experiment.

Studies to control glycemia in diabetic rats have been conducted with subcutaneous implants requiring high amounts of insulin. Brown et al. [40] and Miyazaki et al. [41] implanted insulin-loaded matrices of ethylene-vinyl alcohol (EVA) in the rat and were able to maintain blood glucose at normal values in diabetic rats for 30 days. This method was effective but required high amounts of insulin, 235 IU (1270 IU/kg). Zhang et al., in a different approach, used insulin-loaded poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles which were administered by intratracheal instillation to healthy rats. The doses used were much lower (5-20 IU/kg) and the level of glycemia was reduced to 30% of its initial value for 10 hours at a dose of 20 IU/kg [15]. Our study utilized diabetic rats and a slightly lower dose of insulin-loaded RSA-PEG microparticles (18 IU/kg). Nevertheless, the level of glycemia was reduced to 20% of its initial value. The higher decrease of the level of glycemia with lower doses of insulin might reflect the weaker physiological status of the diabetic rat, which is unable to adjust its blood glucose to a normal level.

### **Microparticle pulmonary biocompatibility in diabetic rats**

Seven days after a unique intratracheal instillation, the animals were sacrificed to assess lung integrity. Several known markers of pulmonary inflammation (LDH, alkaline phosphatase, cell number) were evaluated (Table 2). Cell numbers in healthy rats, Group 1, were significantly lower than in diabetic rats (Groups 2 to 6) suggesting that instillation is less of an innocuous factor than the complications provoked by diabetes. Diabetic rats from Groups 3 and 4 showed significant increases in cell numbers relative to Groups 1, 2, 5 and 6. Group 4 was instilled with insulin-loaded microparticles while group 3 received only insulin-free microparticles. Both groups elicited a strong cellular response because of the particulate nature of the instilled solution. The presence of insulin in the microspheres administered to rats from Group 4 does not explain this difference since diabetic rats treated with saline (Group 2) or insulin (Groups 5 and 6) showed basically the same cell numbers. Both the diabetic status and the particulate nature of the instilled material appear to play a role in the increase in cell numbers in microparticle-treated rats.

LDH activity in the bronchoalveolar wash is indicative of cellular death, which affects endothelial vascular cells following pulmonary inflammation [36]. The levels of this cytosolic enzyme were significantly lower in Group 1 (healthy rats) when compared to Groups 2 to 6 consisting of diabetic rats. High cell numbers in diabetic rats from Groups 2 to 6, combined with high LDH activity, suggests a high turnover of cells and possibly an infection in the lungs. Diabetic rats from Group 3 treated with insulin-free microparticles and from group 4 treated with insulin-loaded microparticles have statistically significant differences. However, they still follow the general trend of increased LDH activity observed in all diabetic rats compared to healthy rats.

The presence of alkaline phosphatase in the bronchoalveolar wash is associated with type I alveolar epithelial cell injury [42]. Only diabetic rats from Group 4 treated with insulin-loaded microparticles and from Group 6 injected subcutaneously with an insulin solution showed significantly higher levels of alkaline phosphatase activity, when compared to the healthy rats from Group 1. Rats from Group 6 are diabetic as are those from Groups 2, 3 and 5 but they were never instilled or anesthetized, it is not obvious why such an increase of alkaline phosphatase activity was observed. The diabetic status or the instillation procedure can nevertheless be ruled out.

Alveolar macrophages retrieved from the bronchoalveolar wash of diabetic rats from Groups 2 to 6 showed a significantly higher level of phagocytic activity *in vitro* in the presence of latex beads when compared to Group 1. There were no significant differences in phagocytic activity between the alveolar macrophages retrieved from diabetic rats from Group 3 treated with insulin-free microparticles and those from Group 4 treated with insulin-loaded microparticles. Alveolar macrophages from Group 6 diabetic rats injected subcutaneously with an insulin solution showed a much higher level of phagocytosis of latex beads compared to Groups 2-5 which were diabetic but were instilled intratracheally. This indicates that both the diabetic status and the effect of instillation have an influence on the functional integrity of alveolar macrophages. Diabetic rats from Group 6 received subcutaneous injections of insulin solution but were never anesthetized or instilled intratracheally, so there was no pulmonary stress or exposure to isoflurane. These factors might account for the higher phagocytic activity of their alveolar macrophages when compared to those from other diabetic rats (Groups 2-5). It is known that macrophages from streptozotocin-induced diabetic rats have

functional alterations which reduced their phagocytic capacity [43]. Furthermore, anesthesia might complicate matters since it has been shown that uncontrolled diabetes lowers significantly in the rat the anesthetic requirement [44]. The overexposure of the diabetic rats to isoflurane during anesthesia might alter the functional integrity of the alveolar macrophages as has been reported in patients anesthetized with isoflurane [45]. Glycemia values up to seven days after the intratracheal instillation showed high blood glucose concentrations ( $>20\text{mM}$  glucose) for the diabetic rats. The streptozotocin-induced diabetic state in the animals was maintained for the duration of the experiment.

## CONCLUSIONS

Intratracheal instillation is an effective method to deliver protein-loaded microparticles into the lung. PEG-albumin microparticles we developed accumulated preferentially in the left lung of rats and at low doses ( $40\text{mg/rat}$ ) showed no adverse effect. When loaded with insulin, the microparticles induced a decrease to almost normal values of the glycemia, from  $25\text{--}27\text{mM}$  to  $4\text{--}5\text{mM}$ , within 2 hours following administration in streptozotocin-induced diabetic rats and normal values were maintained until 8 hours after instillation. Few studies were done on the control of diabetes in rats by microparticles administered via the lung. This work shows the feasibility and the usefulness of hydrogel microparticles for controlling the delivery of peptide drugs in the systemic circulation.



**ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to thank the Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie, the Fonds de Formation et d'Aide à la Recherche and the Université du Québec à Montréal for their financial support. Our special thanks to Ms Marie-Claude Gagnon, D.M.V., for her help in setting up the experiments, to Ms Sophie Ouellette and Ms Pascale Chamberland (UQAM) for their help during manipulation of the rats and to Dr Roch Thibert (Merck Frosst Canada, Montreal) for giving us access to the Malvern 2600 for particle size measurement.

## REFERENCES

- 1-Byron P. (1990) Determinants of drug and polypeptide bioavailability from aerosols delivered to the lung. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 5, 107-132.
- 2- Choi W.S., Krishna Murthy G., Edwards D.A., Langer R. and Klibanov A.M. (2001) Inhalation delivery of proteins from ethanol suspensions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11103-11107.
- 3- Niven R.W. (1995) Delivery of biotherapeutics by inhalation aerosol. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 12, 151-173.
- 4- Patton J.S. and Platz R.M. (1992) Pulmonary delivery of peptides and proteins for systemic action. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 8, 179-196.
- 5- Johnson K.A. (1997) Preparation of peptide and protein powders for inhalation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26, 3-15.
- 6-Schanker L.S., Mitchell E.W. and Brown R.A. (1986) Species comparison of drug absorption from the lung after aerosol inhalation or intratracheal injection. *Drug Metab. Disposition* 14, 79-88.
- 7-Schanker L.S. (1978) Drug absorption from the lung. *Biochem. Pharmacol.* 27, 381-385.
- 8- Pillai R.S., Hughes B.L., Wolff R.K., Heisserman J.A. and Dorato M.A. (1996) The effect of pulmonary-delivered insulin on glucose level using two nebulizer systems. *J. Aerosol Med.* 9, 227-240.
- 9- Niven R.W., Lott F.D. and Cribbs J.M. (1993) Pulmonary absorption of recombinant methionyl human granulocyte colony stimulating factor after intratracheal instillation to the hamster. *Pharm. Res.* 10, 1604-1610.
- 10- Bhat P.G., Flanagan R. and Donovan M.D. (1995) The limiting role of mucus in drug absorption: drug permeation through mucus solution. *Int. J. Pharm.* 126, 179-187.
- 11-Gehr P., Geiser M., Im Hof V., Schurch S., Waber U. and Baumann M. (1993) Surfactant and inhaled particles in the conducting airways: structural, stereological and biophysical aspects. *Microsc. Res. Technol.* 26, 423-436.
- 12- Williams M.C. (1984) Endocytosis in alveolar type II cells: effect of charge and size of tracers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6054-6058.
- 13- Sugar A.M. and Field K.G. (1988) Characterization of murine bronchoalveolar macrophage respiratory burst: comparison of soluble and particulate stimuli. *J. Leukocyt. Biol.* 44, 500-510.

- 14- Takemura R. and Werb Z. (1984) Secretory products of macrophages and their physiological functions. *Am. J. Physiol.* 246, C1-C9.
- 15- Zhang Q., Shen Z. and Nagai T. (2001) Prolonged hypoglycemic effect of insulin-loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles after pulmonary administration to normal rats. *Int. J. Pharm.* 218, 75-80.
- 16- Edwards D.A., Ben-Jebria A. and Langer R. (1998) Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. *J. Appl. Physiol.* 85, 379-385.
- 17- Skubitz K.M. and Anderson P.M. (2000) Inhalational interleukin-2 liposomes for pulmonary metastases: a phase I clinical trial. *Anticancer Drugs* 11, 555-563.
- 18- Kawashima Y., Yamamoto H., Takeuchi H., Fujioka S. and Hino T. (1999) Pulmonary delivery of insulin with nebulized DL-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres to prolong hypoglycemic effect. *J. Control. Release* 62, 279-287.
- 19- Houghton C.L., Dillehay D.L. and Phillips L.S. (1999) Insulin replacement for the rat model of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Lab. Anim. Sci.* 49, 639-644.
- 20- Ar-Rajab A. and Ahren B. (1993) Long-term diabetogenic effect of streptozotocin in rats. *Pancreas* 8, 50-57.
- 21- Bell R.H. and Hye R.J. (1983) Animal models of diabetes mellitus : physiology and pathology. *J. Surg. Res.* 35, 433-460.
- 22- Driscoll K.E., Costa D.L., Hatch G., Hendreson R., Oberdorster G., Salem H. and Schlesinger R.B. (2000) Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity : uses and limitations. *Toxicol. Sci.* 55, 24-35.
- 23- Fortier G. and Laliberté M. (1993) Surface modification of horseradish peroxidase with poly (ethylene glycol)s of various molecular masses. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17, 115-130.
- 24- He P., Jean-Francois J. and Fortier G. Synthesis of hydrogel microparticles of PEG-BSA. To be submitted.
- 25- Cambron H., Latulippe J.F., Nguyen T. and Cartier R. (1995) Orotracheal intubation of rats by transillumination. *Lab. Anim. Sci.* 45, 13-14.
- 26- Reasor M. J. and Antonini J.M. (2001) Pulmonary responses to single versus multiple intratracheal instillations of silica in rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 62, 9-21.
- 27- Gettins P., Metzler M. and Coleman J.E. (1985) <sup>31</sup>P NMR of alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* 260, 2875-2883.

- 28- Sigma Diagnostics. Lactate dehydrogenase, quantitative, kinetic determination in serum at 340nm. Procedure No 340-UV.
- 29-Uff C.R., Pockley A.G. and Phillips R.K.S. (1993) A rapid microplate-based fluorimetric assay for phagocytosis. *Immunol. Invest.* **22**, 407-413.
- 30- Jean-Francois J., Liu Y. and Fortier G. Hydrogel microparticles of PEG-albumin : Influence of size and surface nature on their biodistribution and elimination in rat. To be submitted.
- 31- Mc Cullough H.N. and Juliano R.L. (1979) Organ-selective action of an antitumor drug: Pharmacologic studies of liposome-encapsulated  $\beta$ -cytosine arabinoside administered via the respiratory system of the rat. *J. Natl. Cancer Inst.* **63**, 727-731.
- 32- Brain J.D., Knudson D.E., Sorokin S.P. and Davis M.A. (1976) Pulmonary distribution of particles given by intratracheal instillation or by aerosol inhalation. *Environ. Res.* **11**, 13-33.
- 33- Jurima-Romet M., Barber R.F., Demeester J. and Shek P.N. (1990) Distribution studies of liposome-encapsulated glutathione administered to the lung. *Int. J. Pharm.* **63**, 227-235.
- 34- Nemmar A., Vanbilloen H., Hoylaerts M.F., Hoet P., Verbruggen A. and Nemery B. (2001) Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 1665-1668.
- 35- Liu Y. and Fortier G. Surface modification of microparticles and evaluation of the stability of loaded enzymes. To be submitted.
- 36- Young S.H., Robinson V.A., Barger M., Porter D.W., Frazer D.G. and Castranova V. (2001) Acute inflammation and recovery in rats after intratracheal instillation of zymosan A. *J. Toxicol. Environ. Health* **64**, 311-325.
- 37- Korsmeyer R.W. (1991) Diffusion controlled systems: hydrogels. In *Polymers for Controlled Drug Delivery*. Tarcha P.J., Ed., CRC Press, Boston, p15-37.
- 38- Haineault C. (1999) Controlled release from PEG-albumin microparticles. University of Quebec at Montreal. M.Sc. thesis
- 39- Morishita M., Morishita I., Takayama K., Machida Y. and Nagai T. (1992) Novel oral microspheres of insulin with protease inhibitor protecting from enzymatic degradation. *Int. J. Pharm.* **78**, 1-7.
- 40- Brown L., Munoz C., Siemer L., Edelman E. and Langer R. (1986) Controlled release of insulin from polymer matrices. Control of diabetes in rats. *Diabetes* **35**, 692-697.

- 41- Miyazaki S., Yokouchi C. and Takada M. (1988) Sustained release of insulin from a hydrophilic polymer matrix implanted in diabetic rats. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 3689-3691.
- 42- Venkatesan N. and Chandrakasan (1994) Cyclophosphamide induced early biochemical changes in lung lavage fluid and alterations in lavage cell function. *Lung* **172**, 147-158.
- 43- Abrass C.K. and Hori M. (1984) Alterations in Fc receptor function of macrophages from streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Immunol.* **133**, 1307-1312.
- 44- Brian Jr J.E., Bogan L., Kennedy R.H. and Seifen E. (1993) The impact of streptozotocin-induced diabetes on the minimum alveolar anesthetic concentration of inhaled anesthetics in the rat. *Anesth. Analg.* **77**, 342-345.
- 45- Kotani N., Hashimoto H., Sessler D.I., Kikuchi A., Suzuki A., Takahashi S., Muraoka M. and Matsuki D. (1998) Intraoperative modulation of alveolar macrophages function during isoflurane and propofol anesthesia. *Anesthesiology* **89**, 1125-1132.

## CAPTIONS

**Figure 1:** Biodistribution of radioactive 3 $\mu$ m RSA-PEG microparticles in the lung of healthy rats. Rats were anesthetized and intratracheally instilled with 200 $\mu$ l (278nCi/rat) of radioactive 3 $\mu$ m RSA-PEG microparticles. Rats were euthanasized 1h after the beginning of the experiment and the different parts of the lung were isolated and radioactivity was evaluated. Each bar is the average of 6 rats.

**Figure 2:** Behaviour of insulin solution (5.4IU) ( $\circ$ ) and insulin-loaded 3 $\mu$ m RSA-PEG microparticles (5.4IU) ( $\square$ ) at pH 7.4 in saline solution at room temperature in a spectrophotometric release apparatus. The results are the average of three experiments. Error bars are omitted for sake of clarity

**Figure 3:** Hypoglycemic effect of a single intratracheal administration of insulin-loaded 3 $\mu$ m RSA-PEG microparticles in diabetic rats. The animals were anesthetized and intratracheally instilled. Group 1 ( $\circ$ ) was made of healthy rats and instilled with 200 $\mu$ l of saline solution. Group 2 ( $\square$ ) was made of diabetic rats and instilled with 200 $\mu$ l of saline solution. Group 3 ( $\diamond$ ) was made of diabetic rats and instilled with 200 $\mu$ l of RSA-PEG insulin-free microparticles. Group 4 ( $\bullet$ ) was made of diabetic rats and instilled with 200 $\mu$ l of RSA-PEG insulin-loaded 5.4IU microparticles. Group 5 ( $\blacksquare$ ) was made of diabetic rats and instilled with 200 $\mu$ l of a 2mg/ml insulin solution (5.4IU). Group 6 ( $\blacktriangle$ ) was made of diabetic rats and injected subcutaneously with 200 $\mu$ l of a 2mg/ml insulin solution (5.4IU). Error bars are omitted for sake of clarity

**Table 1:** Short term cellular and biochemical response of intratracheally treated rats.

Treatment	Cell number (10 <sup>5</sup> cells)	LDH (mU/ml)	Alkaline phosphatase (mU/ml)	Phagocytosis (RFU/mg protein)
PBS	1.88 ± 0.32*	1.80 ± 0.33*	1.60 ± 0.74*	632 ± 101* <sup>†</sup>
Microparticle	1.42 ± 0.12*	1.30 ± 0.58*	1.22 ± 0.15*	215 ± 30*
LPS	3.26 ± 0.50	2.73 ± 0.43	4.22 ± 1.15	3877 ± 565

Values for each group are the average of 4 rats. \*Statistically significant differences (p<0.001 vs LPS treated group). <sup>†</sup>Statistically significant differences (p< 0.05 vs microparticle treated group).

**Table 2:** Bronchoalveolar response of healthy and diabetic rats to intratracheal instillation after seven days.

	Cell number (10 <sup>5</sup> cells)	LDH (mU/ml)	Alkaline phosphatase (mU/ml)	Phagocytosis (RFU/mg protein)
Group 1	2.00 ± 0.14	2.14 ± 0.02	1.49 ± 0.14	706 ± 72
Group 2	3.28 ± 0.24*	3.64 ± 0.04*	1.47 ± 0.06	1532 ± 376*
Group 3	7.20 ± 0.60* <sup>†</sup>	3.97 ± 0.04* <sup>†</sup>	1.75 ± 0.03 <sup>†</sup>	1509 ± 203*
Group 4	5.40 ± 0.24*	4.44 ± 0.05*	3.50 ± 0.02*	1191 ± 75*
Group 5	3.48 ± 0.16*	4.26 ± 0.03*	1.74 ± 0.16	1327 ± 69*
Group 6	3.68 ± 0.24*	4.28 ± 0.04*	2.46 ± 0.03*	3912 ± 398*

Values for each group are the average of 3 rats. \* Statistically significant differences ( $p < 0.001$  vs Group 1). <sup>†</sup> Statistically significant differences ( $p < 0.001$  vs group 4).

Group 1: Healthy rats instilled with 200µl sterile saline.

Group 2 : Diabetic rats instilled with 200µl sterile saline.

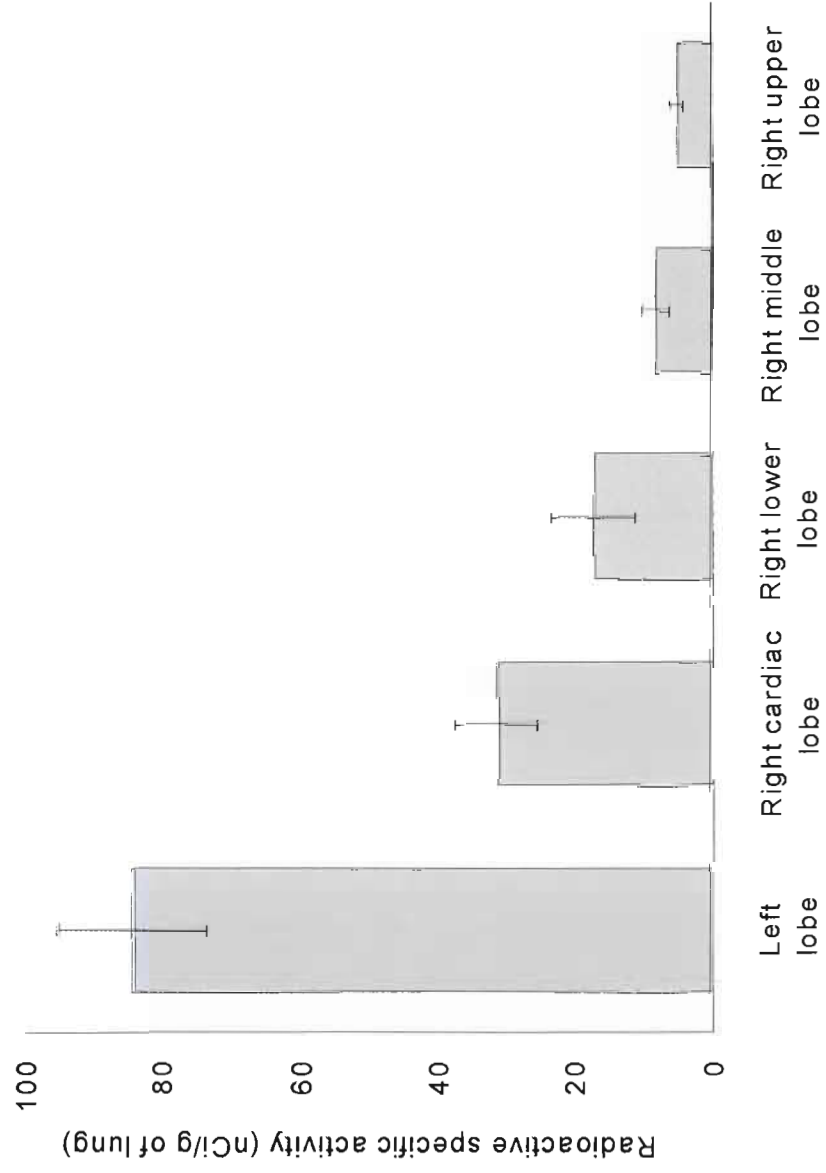
Group 3 : Diabetic rats instilled with 200 µl empty microparticles.

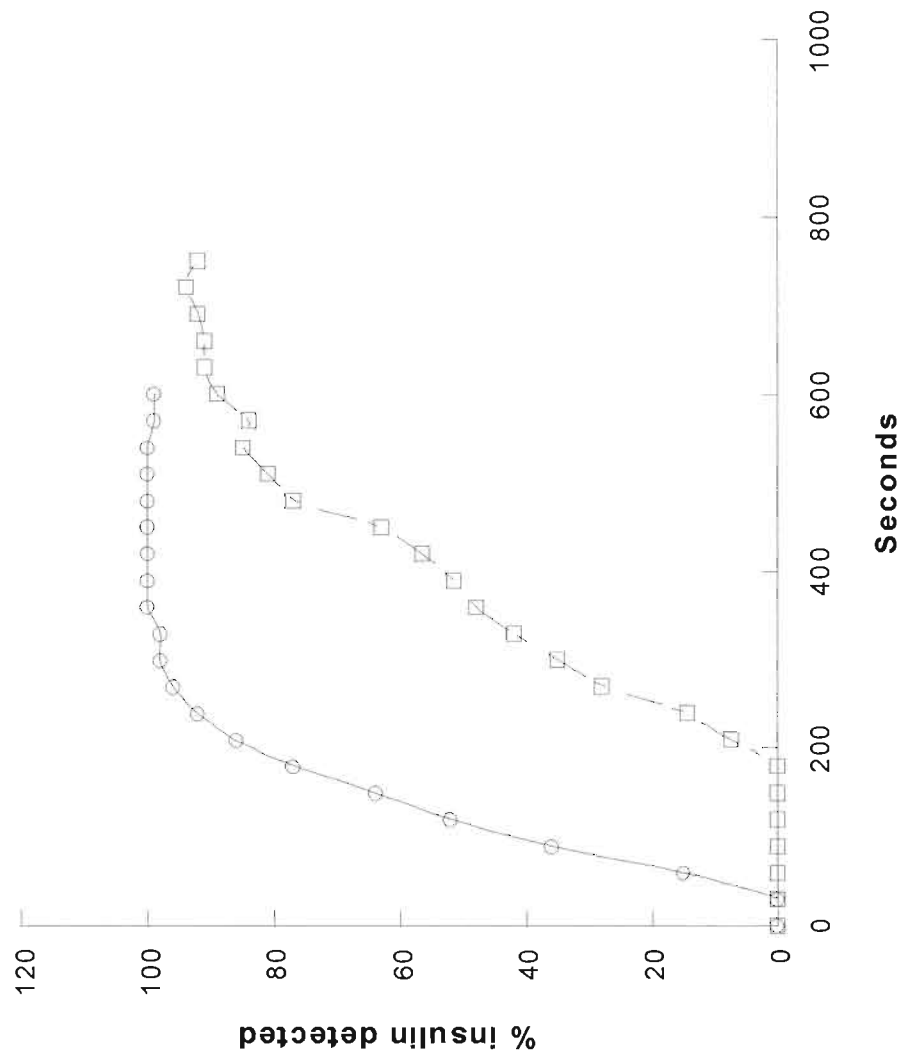
Group 4 : Diabetic rats instilled with 200µl insulin-loaded microparticles (5.4IU insulin).

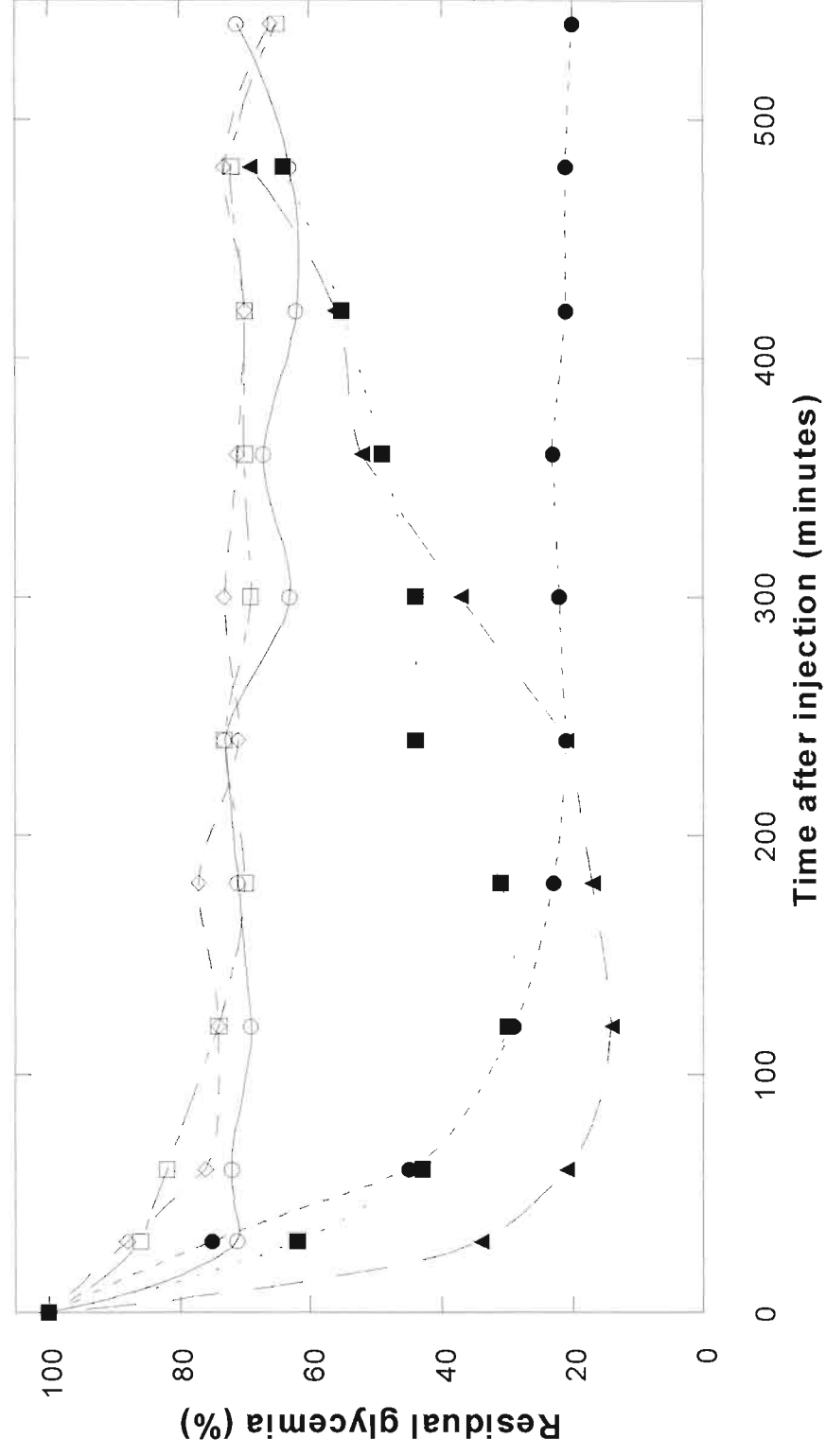
Group 5 : Diabetic rats instilled with 200µl insulin solution (5.4 IU).

Group 6 : Diabetic rats injected subcutaneously with 200µL insulin solution (5.4 I.U).









### 3.0 CONCLUSION

Ce projet a démontré la possibilité de synthétiser des microparticules hydrophiles stables de diamètre variant entre 3 et 50 $\mu$ m. Les microparticules sont obtenues par une émulsion "eau dans huile" sous agitation mécanique. L'huile constitue la phase de dispersion et dans la phase aqueuse, la phase dispersée, il se produit une réticulation covalente d'albumine de sources diverses (bœuf, rat) avec du poly(éthylène glycol). La taille de ces microparticules est réglée par la vitesse d'agitation mécanique et la masse moléculaire du poly(éthylène glycol) (PEG) utilisée pour la synthèse. Ces deux paramètres sont relativement simples à contrôler et ceci accroît la versatilité de la méthode de synthèse. En manipulant l'un ou l'autre de ces paramètres, il devient possible de synthétiser toute une gamme de taille de microparticules pour des applications spécifiques. Ainsi, une administration au niveau des poumons requiert des particules de 3 $\mu$ m de diamètre alors que des particules de 50 $\mu$ m sont employées dans la vaccination par voie orale. Le type d'albumine peut être choisi en fonction de l'hôte pour éviter les réactions immunitaires associées à l'administration de protéines étrangères. Finalement, la stabilité et le contenu en eau élevé de ces microparticules, de 96 à 98%, en fait un vecteur idéal pour les peptides et les protéines d'intérêt thérapeutique lors d'applications *in vivo*.

L'incubation des particules de PEG-albumine de 3 $\mu$ m dans une solution à faible concentration de Triton X-100 (0.1% v/v) permet de maintenir plus de 10% de la dose injectée en intraveineuse en circulation pendant plus de 3heures. Des particules aminées, pegylées et lipidées, ayant un potentiel zêta de -11mV, -18mV, -14mV respectivement, ont été obtenues par la modification chimique de surface des microparticules natives de 3 $\mu$ m de potentiel zêta -19mV. A doses identiques, les microparticules aminées qui ont le plus faible potentiel zêta, circulent plus longtemps que les autres microparticules. La reconnaissance des particules aminées par le SRE semble être moins efficace et cela prolonge leur temps de résidence dans le sang. On observe, indépendamment de la charge de surface, des temps de demi-vie élevés (6 à 8 heures) dans le sang pour toutes les préparations de particules de 3 $\mu$ m. Ce phénomène est sans nul doute attribuable au Triton X-100 qui augmente l'hydrophilicité de surface des particules et retarde leur capture par

le SRE. En effet, les particules natives préparées en absence de Triton disparaissent en moins de 3 minutes de la circulation.

Les différentes préparations de microparticules de 3 $\mu$ m de PEG-albumine (natives, aminées, pegylées et lipidées) ont été injectées dans la cavité péritonéale de rats. Il n'a été détecté, en comparaison avec un groupe traité avec une solution saline, aucune différence significative au niveau des marqueurs de l'activation des macrophages comme le nombre de cellules ou l'activité leucine aminopeptidase (LAP). La seule exception est l'augmentation de l'activité phagocytaire des macrophages péritonéaux qui découlerait de la nature particulière du vecteur injecté dans la cavité péritonéale. Le potentiel zêta des particules injectées dans la cavité péritonéale semble déterminer l'activité phagocytaire *in vitro* des macrophages péritonéaux. Ainsi, les macrophages péritonéaux isolés chez les rats traités avec des particules aminées (-11mV) présentent, *in vitro* et en présence de microbilles de latex de 2 $\mu$ m, la moitié de l'activité phagocytaire retrouvée chez les macrophages provenant de rats traités avec des microparticules natives (-19mV). L'absence de réaction inflammatoire notable, en fonction de la nature de la surface des microparticules de 3 $\mu$ m et en fonction du nombre d'injections, suggère que ces microparticules à une dose de 250mg de matériel humide/kg d'animal pourraient être utilisées pour des traitements de courte durée au moins.

La biocompatibilité pulmonaire chez des rats normaux a confirmé les résultats obtenus lors des études de biocompatibilité en cavité péritonéale. L'instillation de microparticules natives de 3 $\mu$ m n'induit pas de différences significatives au niveau des marqueurs de l'inflammation pulmonaire à l'exception de la phagocytose. Les macrophages alvéolaires ont une activité phagocytaire *in vitro* significativement inférieure qui serait attribuable à la saturation de celle-ci, vu le plus grand nombre de microparticules par macrophage pour une même dose donnée, sachant qu'il y a moins de macrophages dans les alvéoles pulmonaires que dans la cavité péritonéale. Le résultat le plus probant et qui justifie l'ensemble du travail présenté ici, a été obtenu quand des rats diabétiques présentant une glycémie initiale de 25-27mM ont été instillés avec des microparticules natives de 3 $\mu$ m chargées d'insuline (5.4IU). 3 heures après l'instillation endotrachéale, la glycémie résiduelle était de 20% et s'est maintenue pendant toute la durée de l'expérience (8h). A doses égales, l'insuline libérée des microparticules de 3 $\mu$ m

induit chez des rats diabétiques une diminution marquée et durable de la glycémie comparativement à une solution d'insuline instillée ou injectée en sous-cutanée qui a un effet transitoire (3-4h). Sept jours après une instillation unique, les marqueurs de l'inflammation pulmonaire chez les rats diabétiques sacrifiés ont été examinés. Les rats traités avec des microparticules de 3 $\mu$ m vides ou chargées avec de l'insuline montre une augmentation significative du nombre de cellules et de l'activité LDH ce qui suggère une infection non résorbée. L'ensemble des rats diabétiques par rapport aux rats normaux montrent des niveaux plus élevés de leur nombre de cellules, de l'activité LDH et de la phagocytose. D'autre part, les rats diabétiques traités en sous-cutané, qui n'ont pas été anesthésiés ou instillés, montrent des niveaux élevés de phagocytose par rapport aux rats diabétiques qui ont été anesthésiés et instillés. L'analyse des résultats doit donc tenir compte de ces 2 facteurs sur les performances du système immunitaire. Des études plus poussées seront nécessaires pour évaluer l'apport de ces deux facteurs qui semblent jouer un rôle non négligeable sur l'activité des macrophages.

En se basant sur l'ensemble des résultats présentés au cours de cette étude, les microparticules d'albumine-PEG de 3 $\mu$ m se sont révélées des vecteurs très intéressants pour l'administration pulmonaire de peptides et de protéines thérapeutiques, principalement pour des traitements à court terme. Des études à long terme portant sur la toxicologie des particules permettraient de statuer sur leur utilisation chronique comme vecteur de transport de peptides ou de protéines comme l'insuline, l'hormone de croissance et l'érythropoïétine et ce pour des traitements quotidiens à long terme. La comparaison très favorable de nos microparticules d'hydrogel de PEG-albumine avec les résultats obtenus avec d'autres vecteurs particuliers, ouvre la voie à une utilisation clinique et à la mise au point de traitements moins invasifs.

Dans la foulée des résultats obtenus, le développement des microparticules de PEG-albumine demeure possible selon plusieurs axes. Une des voies à explorer viserait à réduire la taille des microparticules en dessous du micron. Ceci diminuerait les risques de phagocytose et augmenterait les performances *in vivo* de ces microparticules en prolongeant leur temps de résidence dans la circulation sanguine et en permettant ultérieurement leur extravasation vers des sites de tumeurs dans le cas d'un traitement. Ces microparticules sont également des matrices de choix pour l'immobilisation

d'enzymes, tel que démontrés par des travaux préliminaires. Enfin la chimie de surface particulière de ces microparticules ouvre la voie au greffage en surface de molécules spécifiques (Ac monoclonaux) pour le ciblage vers des populations cellulaires spécifiques.

## 4.0 Bibliographie

Abuchowski A. Kazo G.M., Verhoest C.R., Van Es T., Kafkewitz D., Nucci M.L., Viau A.T. et Davis F.F. (1984) Cancer therapy with chemically modified enzymes. I. Antitumor properties of poly(ethylene glycol)-asparaginase conjugates. *Cancer Biochem. Biophys.* **7**, 175-186.

Abu-Dahab R., Schafer U.F. et Lehr C.M. (2001) Lectin-functionalized liposomes for pulmonary drug delivery: effect of nebulization on stability and bioadhesion. *Eur. J. Pharm. Sci.* **14**, 37-46.

Adausio R., Doci R., Mazzaferro V., Bellegotti L., Tommasini M., Montalto F., Marchiano A., Piva A., Defazio C., Damascelli B., Gennari L. et Van Thiel D. (1990) Hepatic arterial embolization with microencapsulated mitomycin C for unresectable hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Cancer* **66**, 228-236.

Adjei A.L. et Hsu L. (1993) Leuprolide and other LH-RH analogues. *Pharm. Biotechnol.* **5**, 159-199.

Adjei A., Sundberg D., Miller J. et Chun A. (1992) Bioavailability of leuprolide acetate following nasal and inhalation delivery to rats and healthy humans. *Pharm. Res.* **9**, 244-249.

Adjei L. et Garren J. (1990) Pulmonary delivery of peptide drugs: effect of particle size on bioavailability of leuprolide acetate in healthy male volunteers. *Pharm. Res.* **7**, 565-569.

Al Khoury Fallouh N., Roblot-Treupel L., Fessi H., Devissaguet J.P. et Puisieux F. (1986) Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules. *Int. J. Pharm.* **28**, 125-132.

Allémann E., Gurny R., Skinner F.S. et Schütz H. (1994) Distribution, kinetics and elimination of radioactivity after intravenous and intramuscular injection of savopexine loaded poly(lactic acid) nanospheres to rats. *J. Control. Release* **29**, 97-104.

Allémann E., Gurny R. et Doelker E. (1993) Drug-loaded nanoparticles. Preparation methods and drug targeting issues. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **39**, 173-191.

Allen T.M. (1994) The use of glycolipids and hydrophilic polymers in avoiding rapid uptake of liposomes by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **13**, 285-309.

Allison A. (1978) Macrophage activation and non specific immunity. *Int.Rev. Exp. Pathol.* **18**, 303-346.



Altankov G., Brodvarova I. et Rashkov I. (1991) Synthesis of protein-coated gelatin microspheres and their use as microcarriers for cell culture: Part I Derivatization with native collagen. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2**, 81-89.

Ammoury N., Fessi H., Devissaguet J.P., Dubrasquet M. et Benita S. (1991) Jejunal absorption, pharmacological activity and pharmacokinetic evaluation of indomethacin-loaded poly(D-, L-lactide) and poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules in rats. *Pharm. Res.* **8**, 101-105.

Anderberg E.K., Nystrom C. et Artursson P. (1992) Epithelial transport of drugs in cell culture. VII: Effects of pharmaceutical surfactants excipients and bile acids on transepithelial permeability in monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm. Sci.* **81**, 879-887.

Anderson J.M. et Shive M.S. (1997) Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **28**, 5-24.

Anderson J.M. (1993) Inflammatory responses to implants. *Trans. Am. Soc. Intern. Organs.* **24**, 101-107.

Angelova N. et Hunkeler D. (1999) Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends Biotechnol.* **17**, 409-421.

Aprahamian M., Michel C., Humbert W., Devissaguet J.P. et Damgé C. (1987) Transmucosal passage of polyacyanoacrylate nanocapsules as a new drug carrier in the small intestine. *Biol. Cell.* **61**, 69-76.

Arunothayanum P., Turton J.A., Uchegbu I.F. et Florence A.T. (1999) Preparation and *in vitro/in vivo* evaluation of luteinizing hormone releasing factor (LHRH) loaded polyhedral and spherical tubular niosomes. *J. Pharm. Sci.* **88**, 34-38.

Arruda L.M. et Vitolo M. (1999) Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. *Appl. Biochem. Biotech.* **81**, 23-33.

Aynie I., Vauthier C., Chacun H., Fattal E. et Couvreur P. (1999) Spongelike alginate nanoparticles as a new potential system for the delivery of antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Dev.* **9**, 301-312.

Babensee J. E., Anderson J.M., McIntire L.V. et Mikos A.G. (1998) Host response to tissue engineered devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **33**, 111-139.

- Bangham A.D., Standish M.M. et Watkins J.C. (1965) Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238-252.
- Barratt G.M. (2000) Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *PSIT* **3**, 163-171.
- Barratt G.M., Yu W.P., Fessi H., Devissaguet J.P., Puisieux F., Petit J.F., Tenu J.P., Israel L. and Morère J.F. (1989) Delivery of MDP-L-alanyl-cholesterol to macrophages : comparison of liposomes and nanocapsules. *Cancer* **2**, 439-443.
- Baumann H. et Gauldie J. (1990) Regulation of hepatic acute phase plasma proteins genes by hepatocytes stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol. Biol. Med.* **7**, 147-159.
- Baumgartner I., Pieczek A., Manor O., Blair R., Kearney M., Walsh K. et Isner J.M. (1998) Constitutive expression of rhVEGF following intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* **97**, 1114-1123.
- Beaulac C., Clément-Major S., Hawari J. et Lagacé J. (1996) Eradication of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with fluid liposome-encapsulated tobramycin in an animal model of chronic pulmonary infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 665-669.
- Beck B.D., Brain J.D. et Bohannon D.E. (1982) An *in vivo* hamster bioassay to assess the toxicity of particulates for the lungs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **66**, 9-29.
- Beck J.M., Liggitt H.D., Brunette E.N., Fuchs H.J., Shellito J.E. et Debs R.J. (1991) Reduction in intensity of *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice by aerosol administration of gamma interferon. *Infect. Immun.* **59**, 3859-3862.
- Behl C.R., Pimplaskar H.K., Sileno A.P., deMeireles J. et Romeo V.D. (1998) Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **29**, 89-116.
- Belgoudi J. et Fortier G. (1999) Poly(ethylene glycol)-bovine serum albumin hydrogel as a matrix for enzyme immobilization. *In vitro* biochemical characterization. *J. Bioact. Compat. Poly.* **14**, 31-53.
- Benita S., Zouai O. et Benoit J.P. (1986) 5-fluorouracil carnuba wax microspheres for chemoembolization: an *in vitro* evaluation. *J. Pharm. Sci.* **75**, 847-851.

- Benoit J.P., Faisant N., Venier-Julienne M.C. et Menei P. (2000) Development of microspheres for neurological disorders: from basics to clinical applications. *J. Control. Release* **65**, 285-296.
- Berthiaume Y., Albertine K., Grady M., Fick G. et Matthay M. (1989) Protein clearance from the air spaces and lungs of unanesthetized sheep over 144h. *J. Appl. Physiol.* **67**, 1887-1897.
- Bindschaedler C., Gurny R. et Doekler E. (1990) Process for preparing a powder of water insoluble polymer which can be redispersed in a liquid phase, the resulting powder and utilization thereof. U.S. PAT., 4,968,350.
- Birrenbach G. et Speiser P.P. (1976) Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *J. Pharm. Sci.* **65**, 1763-1766.
- Björk E., Bjurstöm S. et Edman P. (1991) Morphologic examination of rabbit nasal mucosa after nasal administration of degradable starch microspheres. *Int. J. Pharm.* **75**, 73-80.
- Björk E. et Edman P. (1990) Characterization of degradable starch microspheres as a nasal delivery system for drugs. *Int. J. Pharm.* **62**, 187-192.
- Björk E. et Edman P. (1988) Degradable starch microspheres as a nasal delivery system for insulin. *Int. J. Pharm.* **47**, 233-238.
- Blackstock W.P. et Weir M.P. (1999) Proteomics : quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* **17**, 121-134.
- Blaese M., Blankenstein T., Brenner M., Cohen-Haguenauer O., Gansbacher B., Russell S., Sorrentino B. et Velu T. (1995) Vectors in cancer therapy: how will they deliver? *Cancer Gene Ther.* **2**, 291-297.
- Bloom S.R. et Polak J.M. (1985) Regulatory peptides and the lung. *Pediatr. Pulmonol.* **1**, S30-S36.
- Blume G. et Cevc G. (1993) Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* **1146**, 157-168.
- Blume G. et Cevc G. (1990) Liposomes for sustained drug release. *Biochim. Biophys. Acta* **1029**, 91-97.

- Bonduelle S., Foucher C., Leroux J.C., Chouinard F., Cadieux C. and Lenaerts V. (1992) Association of cyclosporin to isohexylcyanoacrylate nanospheres and subsequent release in human plasma *in vitro*. *J. Microencapsul.* **9**, 173-182.
- Boulnois G.J. (2000) Drug discovery in the new millenium : the pivotal role of biotechnology. *Trends Biotechnol.* **18** (1), 31-33.
- Bowden D.H. (1983) Cell turnover in the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* **128**, S46-S48.
- Brain J.D. (1992) Mechanisms, measurement and significance of lung macrophage function. *Environ. Health Perspect.* **97**, 5-10.
- Brasseur F., Verdun C., Couvreur P., Deckers C. et Roland M. (1986) Évaluation expérimentale de l'efficacité thérapeutique de la doxorubicine associée aux nanoparticules de polyalkyl cyanoacrylate. *Proc. 4<sup>th</sup> Int. Conf. On Pharmaceutical Technology*, APGI, Paris, **5**, 177-186
- Brewer J.M. et Alexander J. (1992) The adjuvant activity of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) on the Balb/C humoral response to bovine serum albumin. *Immunology* **75**, 570-575.
- Cahill E.S., O'Hagan D.T., Illum L., Barnard A., Mills K.H. et Redhead K. (1995) Immune responses and protection against *Bordetella pertussis* infection after intranasal immunization of mice with filamentous haemagglutinin in solution or incorporated in biodegradable microparticles. *Vaccine* **13**, 455-462.
- Calvo P., Gouritin B., Chacun H., Desmaele D., D'Angelo J., Noel J.P., Georgin D., Fattal E., Andreux J.P. et Couvreur P. (2001) Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery. *Pharm. Res.* **18**, 1157-1166.
- Cardot J.M. Absorption. Dans *Traité de Biopharmacie et Pharmacocinétique*. Leblanc P.P., Aiache J-M., Besner J.G., Buri P. et Lesne M., Eds. 3<sup>ième</sup> Édition, Les Presses de l'Université de Montréal, Éditions Vigot, 1997, Montréal, Chapitre 3, p 19-53.
- Carette J. Manuel de gérontologie sociale I. Gaetan Morin, Boucherville, 1992, Chapitre 1, p 5-23.
- Carter B.L. (1998) Optimizing delivery systems to tailor pharmacotherapy to cardiovascular circadian events. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **55**, Suppl 3 :S17-23.

- Chandraprakash K.S., Udupa N., Devi P.U. et Pillai G.K. (1993) Effect of niosome encapsulation of methotrexate, macrophage activation on tissue distribution of methotrexate and tumour size. *Drug Deliv.* **1**, 133-137.
- Chazov E.I., Smirnov V.N., Torchilin I.M., Moskvichev V.P., Grimberg G.M., Skuja A.Z. et Kleiner G.I. (1984) Dextran derivatives of fibrinolysin, US Patent No 4446316.
- Chen H. et Langer R. (1998) Oral particulate delivery: status and future trends. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **34**, 339-350.
- Chiannilkulchai N., Driouich Z., Benoit J.P., Parodi A.L. et Couvreur P. (1989) Doxorubicin-loaded nanoparticles: increased efficiency in murine hepatic metastases. *Select. Cancer Ther.* **5**, 1-11.
- Cho N.H., Seong S.Y., Chun K.H., Kim Y.H., Kwon I.C., Ahn B.Y. et Jeong S.Y. (1998) Novel mucosal immunization with polysaccharide-protein conjugates entrapped in alginate microspheres. *J. Control. Release* **53**, 215-224.
- Choi W.S., Krishna Murthy G.G., Edwards D.A., Langer R. et Klibanov A.M. (2001) Inhalation delivery of proteins from ethanol suspensions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 11103-11107.
- Clark A.R. et Egan M. (1994) Modelling the deposition of inhaled powdered drug aerosols. *J. Aerosol Sci.* **25**, 175-186.
- Classen D.C., Pestronik S.L., Evans S.R., Llyod J.F. et Burke J.P. (1997) Adverse drug events in hospitalized patients. *J. Am. Med. Assoc.* **277**, 301-306.
- Clay M.M., Pavia D. et Clarke S.W. (1986) Effect of aerosol particle size on bronchodilatation with nebulized terbutaline in asthmatic subjects. *Thorax* **41**, 364-368.
- Conti B., Giunchedi P., Genta I. et Conte U. (2000) The preparation and *in vivo* evaluation of the wound-healing properties of chitosan microspheres. *STP Pharma* **10**, 101-104.
- Couvreur P., Dubernet C. et Puisieux F. (1995) Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **41**, 2-13.
- Couvreur P. et Puisieux F. (1993) Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **10**, 141-162.

Couvreur P., Kante B., Grislain B., Roland M. et Speiser P. (1982) Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II. Doxorubicin-loaded nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* **71**, 790-792.

Cox D.S. et Taubman M.A. (1984) Oral induction of the secretory antibody response by soluble and particulate antigens. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **75**, 126-131.

Cramer M.P. et Saks S.R. (1994) Value of controlled dosage form. *Pharmacoeconomics* **5**, 482-504.

Cremers H., Feijen J., Kwon G., Bae Y.H., Kim S.W., Noteborn H. and Mcvie J. (1990) Albumin-heparin microspheres as carriers for cytostatic agents. *J. Control. Rel.* **11**, 167-179.

Damascelli B., Cantu G., Mattavelli F., Tamplenizza P., Bidoli P., Leo E., Dosio F., Cerrotta A.M., Di Tolla G., Frigerio L.F., Garbagnati F., Lanocita R., Marchiano A., Patelli G., Spreafico C., Ticha V., Vespro V. et Zunino F. (2000) Intraarterial chemotherapy with polyoxyethylated castor oil free paclitaxel, incorporated in albumin nanoparticles (ABI-007): Phase II study of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck and anal canal: preliminary evidence of clinical activity. *Cancer* **92**, 2592-2602.

Damgé C., Aprahamian M., Marchais H., Benoît J.P. et Pinget M. (1996) Intestinal absorption of PLGA microspheres in the rat. *J. Anat.* **189**, 491-501.

Damgé C., Michel C., Aprahamian M., Couvreur P. and Devissaguet J.P. (1990) Nanocapsules as carriers for oral delivery of peptides. *J. Control. Release* **13**, 233-239.

Damgé C., Michel C., Aprahamian M. et Couvreur P. (1988) New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carrier. *Diabetes* **37**, 246-251.

Davidson R.N., Croft S.L., Scott A., Maini M., Moody A.H. et Bryceson A.D. (1991) Liposomal amphotericin B in drug-resistant leishmaniasis. *Lancet* **337**, 1061-1062.

Davies C.N., Heyder J. et Subba Ramu M.C. (1972) Breathing of half-micron aerosols I. Experimental. *J. Appl. Physiol.* **32**, 591-600.

Davis S.S. (2001) Nasal vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **51**, 21-42.

Davis S.S. (1999) Delivery of peptide and non-peptide drugs through the respiratory tract. *PSIT* **2**, 450-456.

Davis S.S. (1997) Biomedical applications of nanotechnology : implications for drug targeting and gene therapy. *Trends Biotechnol.* **15**, 217-224.

DeLamarter J.F. (1988) Hemopoietic colony stimulating factors. A physiological and pharmacological role in fighting infection? *Biochem. Pharmacol.* **37**, 3057-3062.

Delgado C., Francis, G.E. et Derek F. (1992) The uses and properties of PEG-linked proteins. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **9**, 249-304.

Demers N., Agostinelli E., Averill-Bates D. et Fortier G. (2001) Immobilization of native and poly(ethylene glycol)-treated (PEGylated) bovine serum amine oxidase into a biocompatible hydrogel. *Biotech. Appl. Biochem.* **33**, 201-207.

Desai M.A., Mutlu M. et Vagdama P. (1992) A study of macromolecular diffusion through native porcine mucus. *Experimentia* **48**, 22-26.

Desai M.A. et Vagdama P. (1991 a) Estimation of effective diffusion coefficients of model solutes through gastric mucus: assessment of a diffusion chamber technique based on spectrophotometric analysis. *Analyst* **116**, 1113-1116.

Desai M.A., Nicholas C.V. et Vagdama P. (1991 b) Electrochemical determination of the permeability of porcine mucus to model solute compounds. *J. Pharm. Pharmacol.* **43**, 124-127.

Dinareello C.A. (1984) Interleukin-1. *Rev. Infect. Dis.* **6**, 51-95.

Dodane V., Khan M.A. et Merwin J.R. (1999) Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int. J. Pharm.* **182**, 21-32.

Donovan M.D. et Huang Y. (1998) Large molecule and particulate uptake in the nasal cavity: the effect of size on nasal absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **29**, 157-155.

Durand R., Paul M., Rivollet D., Houin R., Astier A. et Deniau M. (1997) Activity of pentamidine-loaded methacrylate nanoparticles against *Leishmania infantum* in a mouse model. *Int. J. Parasitol.* **27**, 1361-1367.

D'Urso E.M. et Fortier G. (1996) Albumin-poly(ethylene glycol) hydrogel as matrix for enzyme immobilization: Biochemical characterization of crosslinked acid phosphatase. *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 482-488.

D'Urso E.M., Jean-Francois J., Doillon C.J. et Fortier G. (1995) Poly(ethylene glycol)-serum albumin hydrogel as matrix for enzyme immobilization: Biomedical applications. *Art. Cells Blood Subs. and Immob. Biotech.* **23**, 587-595.

Edman P., Björk E. et Ryden L. (1992) Microspheres as a nasal delivery system for peptide drugs. *J. Control. Release* **21**, 165-172.

Edman P., Artursson P., Björk E. et Davidsson B. (1987) Immobilized L-asparaginase-L-glutaminase from *Acinetobacter glutaminasificans* in microspheres: some properties *in vivo* and in an extracorporeal system. *Int. J. Pharm.* **34**, 225-230.

Edman P. et Sjöholm I. (1982) Acrylic microspheres *in vivo* : V. Immunological properties of immobilized asparaginase in microparticles. *J. Pharm. Sci.* **71**, 576-580.

Edman P. et Sjöholm I. (1979a) Acrylic microspheres *in vivo* I. Distribution and elimination of polyacrylamide microparticles after intravenous and intraperitoneal injection in mouse and rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **211**, 656-662.

Edman P. et Sjöholm I. (1979b) Acrylic microspheres *in vivo* II. The effect in rat of L-asparaginase given in microparticles of polyacrylamide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **211**, 663-667.

Edwards D.A., Ben-Jebria A. et Langer R. (1998) Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. *J. Appl. Physiol.* **85**, 379-385.

Edwards D.A., Hanes J., Caponnetti G., Hrkach J., Ben-Jebria A., Eskew M.L., Mintzes J., Deaver D., Lotan N. et Langer R. (1997) Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science* **276**, 1868-1871.

Egilmez N.K., Cuenca R., Yokota S.J., Sorgi F. et Bankert R.B. (1996) *In vivo* cytokine gene therapy of human tumour xenografts in SCID mice by liposomes mediated delivery. *Gene Ther.* **3**, 607-614.

Eisenberg B.L., Taylor D.D. et Weese J.L. (1991) Aerosolized gamma-interferon and lipopolysaccharide enhances cytotoxicity of murine pulmonary alveolar macrophages. *J. Immunother.* **10**, 51-56.



- El Samagily M., Rohdewald P. et Mahmoud H. (1986) Polyalkyl cyanoacrylate nanocapsules. *J. Pharm. Pharmacol.* **38**, 216-218.
- Fabel K., Dietrich J., Hau P., Wismeth C., Winner B., Przywara S., Steinbrecher A., Ullrich W. et Bogdahn U. (2001) Long-term stabilization in patients with maligna glioma after treatment with liposomal doxorubicin. *Cancer* **92**, 1936-1942.
- Fairbanks L.D., Simmonds H.A., Hoogerbrugge P.M., Von Beusechem V.W., Valerio D., Moseley A., Levinsky R.J., Gaspar H.B. et Morgan G. (1994) Biochemical and immunological status following gene therapy and PEG-ADA therapy for adenosine deaminase (ADA) deficiency. *Adv. Exp. Med. Biol.* **370**, 391-394.
- Farraj N.F., Johansen B.R., Davis S.S et Illum L. (1990) Nasal administration of insulin using bioadhesive microspheres as a delivery system. *J. Control. Release* **13**, 253-261.
- Farrugia C.A. et Groves M.J. (1999) The activity of unloaded gelatin microspheres on murine melanoma B16-F0 growth *in vivo*. *Anticancer Res.* **19**, 1027-1031.
- Fasano A. (1998) Novel approaches for oral delivery of macromolecules. *J. Pharm. Sci.* **87**, 1351-1356.
- Fernandez-Urrusuno R., Calvo P., Remunan-Lopez C., Vila-Jato J.L. et Alonso M.J. (1999) Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.* **16**, 1576-1581.
- Fisher A.N., Illum L., Davis S.S. et Schacht E.H. (1991) Di-iodo-L-tyrosine-labelled dextrans as molecular size markers of nasal absorption in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* **44**, 550-554.
- Florence A.T., Hillery A.M., Hussain N. et Jani P.U. (1995) Factors affecting the oral uptake and translocation of polystyrene nanoparticles: histological and analytical evidence. *J. Drug Target.* **3**, 65-70.
- Folkesson, H., Weström B., Pierzynowski S., Svendsen J. et Karlsson B. (1993) Lung to blood passage of albumin and a nonapeptide after intratracheal instillation in the young developing pig. *Acta Physiol. Scand.* **147**, 173-178.
- Folkesson H., Weström B. Dahlbäck M., Lundin S. et Karlsson B. (1992) Passage of aerosolized BSA and the nonapeptide dDVAP via the respiratory tract in young and adult rats. *Exp. Lung Res.* **18**, 595-614.

- Folkesson H., Weström B. et Karlsson B. (1990) Permeability of the respiratory tract to different-sized macromolecules after intratracheal instillation in young and adult rats. *Acta Physiol. Scand.* **139**, 347-354.
- Fontana G., Licciardi M., Mansueto S., Schillachi D. et Giammona G. (2001) Amoxicillin-loaded poly(ethylcyanoacrylate) nanoparticles: Influence of PEG coating on the particle size, drug release rate and phagocytic uptake. *Biomaterials* **22**, 2857-2865.
- Forssen E. et Willis M. (1998) Ligand targeted liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **29**, 249-271.
- Forssen E.A., Coulter D.M. et Profitt R.T. (1992) Selective *in vivo* localization of daunorubicin small unilamellar vesicles in solid tumors. *Cancer Res.* **52**, 3255-3261.
- Fortier G. (1994) Biomedical applications of enzymes and their polyethylene glycol adducts. *Biotech. Genet. Eng. Rev.* **12**, 329-356.
- Fults K.A. et Johnson T.P. (1990) Sustained release of urease from a poloxamer gel matrix. *J. Parenter. Sci. Technol.* **44**, 58-65.
- Fundaro A., Cavalli R., Bargoni A., Vighetto D., Zara G.P. et Gasco M.R. (2000) Non-stealth and stealth solid lipid nanoparticles (SLN) carrying doxorubicin: pharmacokinetics and tissue distribution after i.v. administration to rats. *Pharmacol. Res.* **42**, 337-343.
- Gabizon A. et Papahadjopoulos (1994) The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* **1103**, 94-100.
- Gallo J.M., Hung C.T. et Perrier D.G. (1984) Analysis of albumin microspheres preparation. *Int. J. Pharm.* **22**, 63-74.
- Gasco M., Carpignano R. et Morel S. (1986) Optimization of doxorubicin incorporation and the yield of polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharm. Acta Helv.* **66**, 28-32.
- Gautier J.C., Grangier J.L., Barbier A., Dupont P., Dussossoy D., Pastor G. et Couvreur P. (1992) Biodegradable nanoparticles for subcutaneous administration of growth hormone releasing factor. *J. Control. Release* **20**, 67-78.
- Gayet J.-C., He P. et Fortier G. (1998) Bioartificial polymeric material: Poly(ethylene glycol) crosslinked with albumin. II Mechanical and thermal properties. *J. Bioactive Compat. Poly.* **13**, 179-187.

Gayet J.-C. et Fortier G. (1996) High water content BSA-PEG hydrogel for controlled release device: evaluation of the drug release properties. *J. Control. Release* **38**, 177-184.

Gehr P., Geiser M., Im Hof V., Schurch S., Waber U. et Baumann M. (1993) Surfactant and inhaled particles in the conducting airways: structural, stereological and biophysical aspects. *Microsc. Res. Technol.* **26**, 423-436.

Gehrke S.H. (2000) Synthesis and properties of hydrogels used for drug delivery. In *Transport Processes in Pharmaceutical Systems*. Amidon G.L., Lee P.I. and Topp E.M., Eds. Marcel Dekker, New York, Chapter 13, p 473-546.

Gehrke S.H. et Lee P.I. (1990) Hydrogels for drug delivery. In *Specialized Drug Delivery Systems, Manufacturing and Production Technology*. Tyle P., Ed. Marcel Dekker, New York, p 333-392.

Ghandehari H., Kopeckova J. et Kopecek J. (1997) *In vitro* degradation of pH-sensitive hydrogels containing aromatic azo bonds. *Biomaterials* **18**, 861-872.

Giannasca P.J., Boden J.A. et Monath T.P. (1997) Targeted delivery of antigen to hamster lymphoid tissue with M-cell-directed lectins. *Infect. Immunol.* **65**, 4288-4298.

Gomez-Orellana I. et Patton D.R. (1998) Advances in the oral delivery of proteins. *Exp. Opin. Ther. Patents* **8**, 223-234.

Gorin A.B. et Stewart P.A. (1979) Differential permeability of endothelial and epithelial barriers to albumin flux. *J. Appl. Physiol.* **47**, 1315-1324.

Gould-Fogerite S., Kheiri M., Zhang F. et Mannino R.J. (2000) Cochleate delivery vehicles: Applications in vaccine delivery. *J. Lipos. Res.* **10**, 339-358.

Grangier J.L., Puygrenier M., Gautier J.C. et Couvreur P. (1991) Nanoparticles as carriers for growth hormone releasing factor. *J. Control. Release* **15**, 3-13.

Gref R., Domb A., Quellec P., Blunk T., Müller R.H., Verbavatz J.M. et Langer R. (1995) The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **16**, 215-233.

Gref R., Minamitake Y., Peracchia M.T., Trubetskoy V.S., Torchilin V.P. et Langer R. (1994) Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* **263**, 1600-1603.

Gurny R., Tabatabay C., Bernatchez S.F., Merkli A., Allémann E., Aftabouchard C.A., Lescure F. et Doelker E. (1993) Biodegradable polymers: contemporary issues and new directions. *Hosp. Pharm.* **3**, 15-19.

Gurny R., Peppas N.A., Harrington D.D. et Banker G.S. (1981) Development of biodegradable and injectable lattices for controlled delivery of potent drugs. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **7**, 1-25.

Gutowska A., Bae Y.H., Feijen J. et Kim S.W. (1992) Heparin release from thermosensitive hydrogels. *J. Control. Rel.* **22**, 95-104.

Harding J.A., Engbers C.M., Newman M.S., Goldstein N.I. et Zalipsky S. (1997) Immunogenicity and pharmacokinetics attributes of poly(ethylene glycol)-grafted immunoliposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1327**, 181-192.

Harper G.R., Davies M.C., Davis S.S., Tadros Th.F., Taylor D.C., Irving M.P. et Waters J.A. (1991) Steric stabilization of microspheres with grafted polyoxyethylene oxide reduces phagocytosis by rat Kupffer cells *in vitro*. *Biomaterials* **12**, 695-700.

Harris A.S., Svensson E., Wagner Z.G., Lethagen D. et Nilsson I.M. (1988) Effect of viscosity on particle size, deposition and clearance of nasal delivery systems containing desmopressin. *J. Pharm. Sci.* **77**, 405-408.

Harris A.S., Nilsson I.M., Wagner Z.G. et Alkner U. (1986) Intranasal administration of peptides: nasal deposition, biological response and absorption of desmopressin. *J. Pharm. Sci.* **75**, 1085-1088.

Hayashi T. et Ikada Y. (1991) Protease immobilization onto porous chitosan beads. *J. Appl. Polym. Sci.* **42**, 85-92.

Heinrich P.C., Castell J.V. et Andus T. (1990) Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* **265**, 621-636.

Heritage P.L., Brook M.A., Underdown B.J. et Mc Dermott M.R. (1998) Intranasal immunisation with polymer-grafted microparticles activates the nasal-associated lymphoid tissue and draining lymph nodes. *Immunology* **93**, 249-256.

- Hersey S.J. et Jackson R.T. (1987) Effect of the bile salts on nasal permeability *in vitro*. *J. Pharm. Sci.* **76**, 876-879.
- Heyder J. et Rudolf G. (1984) Mathematical models of particle deposition in the human respiratory tract. *J. Aerosol Sci.* **15**, 697-707.
- Heyder J., Armbruster L., Bebhart J., Grein E. et Stahlhofen W. (1975) Total deposition of aerosol particles in the human respiratory tract for nose and mouth breathing. *J. Aerosol Sci.* **6**, 311-328.
- Hillery A.M., Jani P.U. et Florence A.T. (1994) Comparative, quantitative study of lymphoid and non-lymphoid uptake of 60nm polystyrene particles. *J. Drug Target.* **2**, 151-156.
- Hirai S., Yaskiki T. et Mima H. (1981) Mechanisms of the enhancement of the nasal absorption of insulin by surfactants. *Int. J. Pharm.* **9**, 173-184.
- Hochman J. et Arthursson P. (1994) Mechanisms of absorption enhancement and tight junction regulation. *J. Control. Release* **29**, 253-267.
- Von Hoegen P. (2001) Synthetic biomimetic supra molecular Biovector<sup>TM</sup> (SMBV<sup>TM</sup>) particles for nasal vaccine delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **51**, 113-125.
- Hoffman A.S. (2002) Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 3-12.
- Hollander D. (1989) Crohn's disease-a permeability disorder of the tight junction? *Gut* **29**, 1621-1624.
- Horbett T.A., Kost J. et Ratner B.D. (1984) Swelling behaviour of glucose sensitive membranes. In *Polymers as Biomaterials*. Shalaby S., Hoffman A.S., Horbett T.A. and Ratner B.D., Eds. Plenum Press, New York, p193-207.
- Hortobagyi G., Ueno N., Xia W., Zhang S., Wolf J., Putnam J., Weiden P., Willey J., Carey M., Branham D., Payne J., Tucker S., Bartholomeusz C., Kilbourn R., De Jager R., Sneige N., Katz R., Anklesaria P., Ibrahim N., Murray J., Theriault R., Valero V., Gershenson D., Bevers M., Huang L., Lopez-Berenstein G. et Hung M. (2001) Cationic liposome-mediated EIA gene transfer to human breast and ovarian cancer cells and its biologic effects: a phase I clinical trial. *J. Clin. Oncol.* **19**, 3422-3433.

Hosoya K.I., Kubo H., Natsume H., Sugibayashi K., Morimoto Y. et Yamashita S. (1994) Evaluation of enhancers to increase nasal absorption using Ussing chamber technique. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 316-322.

Hsu M.J. et Juliano R.L. (1982) Interaction of liposomes with the reticuloendothelial system. II. Nonspecific and receptor mediated uptake of liposomes by mouse peritoneal macrophage. *Biochim. Biophys. Acta* **720**, 411-419.

Hu K.F., Lövgren-Bengtsson K. et Morein B. (2001) Immunostimulating complexes (ISCOMs) for nasal vaccination. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **51**, 149-159.

Hubbard R.C., Casolaro M.A., Mitchell M., Sellers S.E., Arabia F., Matthay M.A. et Crystal R.G. (1989) Fate of aerosolized recombinant DNA-produced alpha1-antitrypsin: use of the epithelial surface of the lower respiratory tract to administer proteins of therapeutic importance. *Proc. Natk. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 680-684.

Hubbard R.C. et Crystal R.G. (1986) Antiproteases and antioxydants: strategies for the pharmacologic prevention of lung destruction. *Respiration* **1**, 56-73.

Hussain A.A. (1998) Intranasal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **29**, 39-49.

Huwylar J., Yang J. et Pardridge W.M. (1997) Receptor mediated delivery of daunomycin using immunoliposomes: Pharmacokinetics and tissue distribution in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **282**, 1541-1546.

Illum L., Watts P., Fisher A.N., Jabbal-Gill I. et Davis S.S. (2000) Novel chitosan based delivery systems for nasal administration of a LHRH-analogue. *STP Pharma* **10**, 89-94.

Illum L., Jabbal-Gill I., Hichcliffé M., Fisher A.N. et Davis S.S. (1998) Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **51**, 81-96.

Illum L., Farraj N.F. et Davis S.S. (1994) Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs. *Pharm. Res.* **11**, 1186-1189.

Illum L. et Davis S.S. (1992) Intranasal insulin. Clinical pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* **23**, 30-41.

Illum L., Farraj N.F., Davis S.S., Johansen B.R. et O'Hagan D.T. (1990) Investigation of the nasal absorption of biosynthetic human growth hormone in sheep-use of a bioadhesive microspheres as a delivery system. *Int J. Pharm.* **63**, 207-211.

Illum L., Farraj N.F., Critchley H. et Davis S.S. (1988) Nasal administration of gentamicin using a novel microsphere delivery system. *Int. J. Pharm.* **46**, 261-256.

Illum L., Davis S.S., Müller R.H., Mak E. et West P. (1987a) The organ distribution and circulation time of intravenously injected colloidal carriers sterically stabilized with a block copolymer-poloxamer-908. *Life Sci.* **40**, 367-374.

Illum L., Jorgensen H., Bisgaard H., Krogsgaard H. et Rossing N. (1987b) Bioadhesive microspheres as a potential nasal drug delivery system. *Int. J. Pharm.* **39**, 189-199.

Illum L. et Davis S.S. (1984) The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using nonionic surfactant (poloxamer 338). *FEBS Lett.* **167**, 79-82

Illum L. et Davis S.S. (1983) Effect of nonionic surfactant Poloxamer 338 on the fate and deposition of polystyrene microspheres following intravenous administration. *J. Pharm. Sci.* **72**, 1086-1090.

Ito Y., Casolaro M., Kono K. et Imanishi Y. (1989) An insulin releasing system that is responsive to glucose. *J. Control. Release* **10**, 195-203.

Jackson S.J., Bush D., Washington N., Ron E.S. et Schiller M. (1997) Determination of the nasal retention of Smart hydrogel™ using gamma scintigraphy (abstract). *J. Pharm Pharmacol.* (suppl.4) **49**, 84.

Jean-Francois J., D'Urso E.M. et Fortier G. (1997) Immobilization of L-asparaginase into a biocompatible poly(ethylene glycol)-albumin hydrogel:evaluation of performance *in vivo*. *Biotech. Appl. Biochem.* **26**, 203-212.

Jean-Francois J. et Fortier G. (1996) Immobilization of L-asparaginase into a biocompatible poly(ethylene glycol)-albumin hydrogel. I- Preparation and *in vitro* characterization. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **23**, 221-226.

Jenning V., Gysler A., Schafer-Korting M. et Gohla S.H. (2000) Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **49**, 211-218.

Jepson M.A., Clark M.A., Foster N., Mason C.M., Bennett M.K., Simmons N.L. et Hirst B.H. (1996) Targeting to intestinal M cells. *J. Anat.* **189**, 507-516.

Jepson M.A., Simmons N.L., Savidge T.C., James P.S. et Hirst B.H. (1993) Selective binding and transcytosis of latex microspheres by rabbit intestinal M cells. *Cell Tissue Res.* **271**, 399-405.

Jepson M.A., Simmons N.L., O'Hagan D.T. et Hirst B.H. (1993) Comparison of poly(DL-lactide-co-glycolide) and polystyrene microsphere targeting to intestinal M cells. *J. Drug. Target.* **1**, 245-249.

Jerry N., Anitha Y., Sharma C.P. et Sony P. (2001) *In vivo* absorption studies of insulin from an oral delivery system. *Drug Deliv.* **8**, 19-23.

Johnson K.A. (1997) Preparation of peptide and protein powders for inhalation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **26**, 3-15.

Johnson M.A., Newman S.P., Bloom R., Talee N. et Clarke S.W. (1989) Delivery of albuterol and ipratropiumbromide from two nebulizer systems in chronic stable asthma. *Chest* **96**, 6-10.

Jones D.H., Mc Bride B.W., Thornton C., O'Hagan D.T., Robinson A. et Farrar G.H. (1996) Protection of mice from *Bordetella pertussis* respiratory infection using orally administered microencapsulated *Pertussis fimbriae*. *Infect. Immun.* **64**, 489-494.

Juliano R.L. et Mc Cullough H. N. (1980) Controlled delivery of an antitumour drug: localized action of liposome encapsulated cytosine arabinoside administered via the respiratory system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **214**, 381-387.

Jung T., Kamm W., Breitenbach A., Hungerer K.D., Hundt E. et Kissel T. (2001) Tetanus toroid loaded nanoparticles from sulfoethylated poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide). Evaluation of antibody response after oral and nasal application in mice. *Pharm. Res.* **18**, 352-360.

Kaliner M., Marom Z., Patow C. et Shelhamer J. (1984) Human respiratory mucus. *J. Allergy Clin. Immunol.* **73**, 318-323.

Kalyanasundaram S., Feinstein S., Nicholson J.P., Leong K.W. et Garver R.I. (1999) Coacervate microspheres as carriers of recombinant adenoviruses. *Cancer Gene Ther.* **6**, 107-112.



- Kamath K. et Park K. (1993) Biodegradable hydrogels in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **11**, 59-84.
- Kararli T.T. (1995) Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm. Drug Disp.* **16**, 351-380.
- Karvonen M., Tuomilhto J., Libman I. et Laporte R. (1993) A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type-I (insulin-dependent) diabetes mellitus. World Health Organization Diamond Project Group. *Diabetologia* **36**, 883-892.
- Katakam M. et Banga A.G. (1997) Controlled release of human growth hormone in rats following parenteral administration of poloxamer gels. *J. Control. Release* **49**, 21-26.
- Katayose S. et Kataoka K. (1998) Remarkable increase in nuclease resistance of plasmid DNA through supramolecular assembly with poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer. *J. Pharm. Sci.* **87**, 160-163.
- Kato T., Nemoto R., Mori H., Takahashi M. et Tamakawa Y. (1981) Transcatheter arterial chemoembolization of renal cell carcinoma with microencapsulated mitomycin C. *J. Urol.* **125**, 19-24.
- Kawashima Y., Yamamoto H., Takeuchi H., Fujioka S. et Hino T. (1999) Pulmonary delivery of insulin with nebulized DL-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres to prolong hypoglycemic effect. *J. Control. Release* **62**, 279-287.
- Kende M., Yan C., Rill W., Malli R., Naseem H., Hewetson J. et Tammariello R. (1995) Oral delivery of ricin toxoid vaccine in microspheres stimulates protective IgA and IgG2a antibodies, *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.* 200-201.
- Khanna C., Anderson P.M., Hasz D.E., Katsanis E., Neville M. et Klausner J.S. (1997) Interleukin-2 liposome inhalation therapy is safe and effective for dogs with spontaneous pulmonary metastases. *Cancer* **79**, 1409-1421.
- Kimura T., Sato K., Sugimoto K., Tao R., Murakami T., Kurosaki Y. et Nakayama T. (1996) Oral administration of insulin as poly(vinyl alcohol)-gel spheres in diabetic rats. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 897-900.
- Kirby C. et Gregoriadis G. (1983) The effect of lipid composition of small unilamellar liposomes containing melphalan and vincristine on drug clearance after injection in mice. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 609-615.

Klibanov A.L., Maruyama K., Torchilin V.P. et Huang L. (1990) Amphipatic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Letters*. **268**, 235-237.

Konigsberg P.J., Godtel R., Kissel T. et Richer L.L. (1998) The development of IL-2 conjugated liposomes for therapeutic purposes. *Biochim. Biophys. Acta* **1370**, 243-251.

Kost J. et Langer R. (2001) Responsive polymeric delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 125-148.

Kramer P.A. (1974) Albumin microspheres as vehicles for achieving specificity in drug delivery. *J. Pharm. Sci.* **63**, 1646-1647.

Kreuter J., Stieneker F. et Löwer J. (1991) Poly(methyl methacrylate) nanoparticles as effective adjuvants for HIV-antigens. *Proc. Int. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mater.* **18**, 277-278.

Kreuter J., Taüber U. et Illi V. (1979) Distribution and elimination of poly(methyl-2-<sup>14</sup>C-methacrylate) nanoparticles radioactivity after injection in rats and mice. *J. Pharm. Sci.* **68**, 1443-1447.

Kreuter J. et Speiser P.P. (1976) *In vitro* studies of poly(methyl methacrylate) adjuvants. *J. Pharm. Sci.* **65**, 1624-1627.

Kubiak C., Manil L. et Couvreur P. (1988) Sorptive properties of antibodies onto cyanoacrylic nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **41**, 181-187.

Kulkarni R.K., Pani K.C., Neuman C. et Leonard F. (1966) Polylactic acid for surgical implants. *Arch. Surg.* **93**, 839-843.

Kushner I. (1982) The phenomen of the acute phase response. *Ann. NY Acad. Sci.* **89**, 39-48.

Kwon G.S. et Kataoka K. (1995) Block copolymer micelles as long circulating drug vehicles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **16**, 295-309.

Lambriss J.D. et Ross C.D. (1982) Assay of membrane complement receptors with C3b and C3d coated fluorescent microspheres. *J. Immunol.* **128**, 186-191.

Lamont J.T. (1992) Mucus : the frontline of intestinal mucosa defense. *Ann. NY Acad. Sci.* **664**, 190-201.

- Langer R. (1998) Drug delivery and targeting. *Nature* **392**, 5-10.
- Langer R. et Folkman J. (1976) Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* **263**, 797-800.
- Larionova N.I., Mityushina G.V., Kazanskaya N.F., Blidchenko V.A. et Berezin I.V. (1985) Carbohydrate-containing derivatives of the trypsin-kallikrein inhibitor aprotinin from bovine organs. II. Inhibitor coupled to the (carboxymethyl)dextran derivatives of D-galactose. *Biol. Chem. Hoppe-Sayler's* **366**, 743-748.
- Lasic D.D. (1998) Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol.* **16**, 307-321.
- Laube B.L. (2001) Treating diabetes with aerosolized insulin. *Chest* **120**, 99S-106S.
- Laube B.L., Georgopoulos A. et Adams G.K. (1993) Preliminary study of the efficacy of insulin aerosol delivered by oral inhalation in diabetic patients. *JAMA* **269**, 2106-2109.
- Lebman D.A. et Coffman R.L. (1988) The effects of IL-4 and IL-5 on the IgA response by murine Peyer's patch B cell subpopulations. *J. Immunol.* **141**, 2050-2056.
- Lehr C.M., Bouwstra J.A., Schacht E.H. et Junginger H.E. (1992) *In vitro* evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int. J. Pharm.* **78**, 43-48.
- Lenaerts V., Couvreur P., Christiaens-Leyh D., Joiris E., Rolland M., Rollman B. et Speiser P. (1984) Degradation of poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. *Biomaterials* **5**, 65-68.
- Li J.T., Caldwell K.D. et Rapoport N. (1994) Surface properties of Pluronic polymeric colloids. *Langmuir* **10**, 4475-4482.
- Li V.H.K., Lee V.H.L. et Robinson J.R.. Influence of drug properties and routes of drug administration on the design of sustained and controlled release systems. In *Controlled Drug Delivery, Fundamentals and Applications*. Robinson J.R. et Lee V.H.L., Eds. Marcel Dekker Inc , New York, Second edition, 1987, Chapter 1, p 3-94.
- Li Y.P., Pei Y.Y., Zhang X.Y., Gu Z.H., Zhou Z.H., Yuan W.F., Zhou J.J., Zhu J.H. et Gao X.J. (2001a) PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J. Control. Release* **71**, 203-211.

- Li Y.P., Pei Y.Y., Zhou Z.H., Zhang X.Y., Gu Z.H., Ding J., Zhou J.J., Gao X.J. et Zhu J.H. (2001b) Stealth polycyanoacrylate nanoparticles as tumor necrosis factor- $\alpha$  carriers: Pharmacokinetics and anti-tumor effects. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 662-665.
- Lim F. et Sun A.M. (1980) Microencapsulated islets as bioartificial pancreas. *Science* **210**, 908-910.
- Litchenberger L.M. (1995) The hydrophobic barrier properties of gastrointestinal mucus. *Ann. Rev. Phys.* **57**, 565-583.
- Liu F.Y., Shao Z., Kildsig D.O. et Mitra A.K. (1993) Pulmonary delivery of free and liposomal insulin. *Pharm. Res.* **10**, 228-232.
- Longuet P., Joly V., Amerault P., Seta N., Carbon C. et Yeni P. (1991) Limited protection by small unilamellar liposomes against the renal tubular toxicity induced by repeated amphotericin B infusion in rats. *Antimicrob. Agent Chemother.* **35**, 1303-1308.
- Loty S., Sautier J.M., Loty C., Boulekbache H., Kokubo T. et Forest N. (1998) Cartilage formation by rat chondrocytes cultured in alginate beads: a proposed model for investigating tissue-biomaterial interactions. *J. Biomed. Mater. Res.* **42**, 213-222.
- Lou Y., Groves M.J. et Klegerman M.E. (1994) *In vivo* and *in vitro* targeting of a murine sarcoma by gelatin microparticles loaded with a glycan (PSI). *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 863-866.
- Lowman A.M., Morishita M., Kajita M., Nagai T. et Peppas N.A. (1999) Oral delivery of insulin using pH-responsive complexation gels. *J. Pharm. Sci.* **88**, 933-937.
- Mc Cormack B. et Gregoriadis G. (1994) Drugs- in -cyclodextrins-in-liposomes, a novel concept in drug delivery. *Int. J. Pharm.* **112**, 249-258.
- Mc Cullough H.N. et Juliano R.L. (1979) Organ selective action of an antitumour drug: pharmacologic studies of liposome-encapsulated beta-cytosine arabinoside administered via the respiratory system of the rat. *J. Natl. Cancer Inst.* **63**, 727-731.
- Mc Dermott M.R., Heritage P.L., Bartzoka V. et Brook M.A. (1998) Polymer-grafted starch microparticles for oral and nasal immunization. *Immunol.. Cell Biol.* **76**, 256-262.

- Mc Ghee J.R., Mestecky J., Dertzbaugh M.T., Eldridge J.H., Hirasawa M. et Kiyono H. (1992) The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* **10**, 75-88.
- Mc Kenney J.M. et Harrison W.L. (1976) Drug related hospital admissions. *Am. J. Hosp. Pharm.* **33**, 792-795.
- Mc Martin C., Hutchinson E.F., Hyde R. et Peters G.E. (1987) Analysis of structural requirements for the absorption of drugs and macromolecules from the nasal cavity. *J. Pharm. Sci.* **76**, 535-540.
- Mc Minn L.H., Hodges G.M. et Carr K.E. (1996) Gastrointestinal uptake and translocation of microparticles in the streptozotocin-diabetic rat. *J. Anat.* **189**, 553-559.
- Ma T.Y., Hollander D., Erickson R.A., Truong H. et Krugliak P. (1991) Is the small intestinal epithelium truly tight to inulin permeation? *Am. J. Physiol.* **260**, G669-G676.
- Machida M., Hayashi M. et Awazu S. (1996) Pulmonary absorption of recombinant human granulocyte stimulating factor (rhG-CSF) after intratracheal administration to rats. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 259-262.
- Mackay M., Phillips J. et Hastewell J. (1997) Peptide drug delivery : Colonic and rectal absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **28**, 253-273.
- Madara J.L. (1989) Loosening tight junctions. Lessons from the intestine. *J. Clin. Invest.* **83**, 1089-1094.
- Madri J.A., Roll F.J., Furthmayer H. et Foidart J.M. (1980) Ultrastructural localization of fibronectin and laminin in the basement membranes of the murine kidney. *J. Cell Biol.* **86**, 682-687.
- Maeda H. Pharmacological uniqueness and clinical effects. In: *Neocarzinostatin: The Past, Present and Future of Anticancer Drugs*. Maeda H., Edo K. and Ishida N. (Eds.). Springer, Tokyo, 1997.
- Maeda H., Seymour L.W. et Miyamoto Y. (1992) Conjugates of anticancer agents and polymers: advantages of macromolecular therapeutics *in vivo*. *Bioconjugate Chem.* **3**, 351-362.
- Maia C.S., Mehnert W. et Schafer-Korting M. (2000) Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. *Int. J. Pharm.* **196**, 165-167.
- Maillet F., Labarre D. et Kazatchkine M.D. (1990) The role of naturally occurring antibodies against man-made materials in biocompatibility. *Transf. Sci.* **11**, 33-41.

Maloy K.J., Donachie A.M., O'Hagan D.T. et Mowat A. Mcl. (1994) Induction of mucosal and systemic immune responses by immunization with ovalbumin entrapped in poly(lactide-co-glycolide) microparticles. *Immunology* **81**, 661-667.

Mantle M. et Husar S.D. (1994) Binding of *Yersinia enterocolitica* to purified, native small intestinal mucins from rabbits and humans involve interactions with the mucin carbohydrate moiety. *Infect. Immun.* **62**, 1219-1227.

Martin E., Verhoef J.C., Cullander C., Romeijn S.G., Nagelkerke J.F. et Merkus F. (1997) Confocal laser scanning microscopic visualization of the transport of dextrans after nasal administration to rats: Effects of absorption enhancers. *Pharm. Res.* **14**, 631-637.

Marty J.J., Oppenheim R.C. et Speiser P. (1978) Nanoparticles, a new colloidal drug delivery system. *Pharm. Acta Helv.* **53**, 17-23.

Maruyama K., Takizawa T., Takahashi N., Tagawa T., Nagaike K. et Iwatsuru M. (1998) Targeting efficiency of PEG-immunoliposome-conjugated antibodies at PEG terminals. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **24**, 235-242.

Marx P.A., Compans R.W., Gettie A., Staas J.K., Gilley R.M., Mulligan M.J., Yamshchikov G.V., Chen D. et Eldridge J.H. (1993) Protection against vaginal SIV transmission with microencapsulated vaccine. *Science* **260**, 1323-1327.

Matsubara K., Abe K., Irie T. et Uekama K. (1995) Improvement of nasal bioavailability of luteinizing hormone-releasing hormone agonist, buserelin by cyclodextrin derivatives in rat. *J. Pharm. Sci.* **84**, 1295-1300.

Menei P., Daniel V., Montero-Menei C., Brouillard M., Pouplard-Barthelaix A. et Benoît J.P. (1993) Biodegradation and brain tissue reaction to poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Biomaterials* **14**, 470-478.

Merkus F., Verhoef J.C., Martin E., Romeijn S.G., van der Kuy P et Hermens W. (1999) Cyclodextrins in nasal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **36**, 41-57.

Merkus F., Schipper N. et Verhoef J.C. (1996) The influence of absorption enhancers on the intranasal insulin absorption in normal and diabetic subjects. *J. Control. Release* **41**, 69-75.

Michel C., Roques M., Couvreur P., Vranckx H., Baldschmidt P. et Damgé C. (1991 a) Isobutyl cyanoacrylate nanoparticles as drug carrier for oral administration of insulin. *Proc. Int. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mater.* **18**, 97-98.

Michel C., Aprahamian M., Defontaine L., Couvreur P. et Damgé C. (1991 b) The effect of site of administration in the gastrointestinal tract on the absorption of insulin from nanocapsules in diabetic rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **43**, 1-5.

Mielcarek N., Nordstrom I., Menozzi F.D., Loch C. et Holmgren J. (2000) Genital antibody responses in mice after intranasal infection with an attenuated candidate vector strain of *Bordetella pertussis* . *Infect. Immun.* **68**, 485-491.

Miller J.D. (1990) Leuprolide acetate for the treatment of endometriosis. *Prog. Clin. Biol. Res.* **323**, 337-341.

Mitra R., Pezron I., Li Y. et Mitra A.K. (2001) Enhanced pulmonary delivery of insulin by lung lavage fluid and phospholipids. *Int. J. Pharm.* **217**, 25-31.

Moghimi S.M. et Hunter A.C. (2000) Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and medicine. *Trends Biotechnol.* **18**, 412-420.

Moghimi S.M., Porter C.J.H., Muir I.S., Illum L. et Davis S.S. (1991) Non phagocytic uptake of intravenously injected microspheres in rat spleen: influence of particle size and hydrophilic coating. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 861-866.

Moldoveanu Z., Novak M., Huang W.Q., Gilley R.M., Staas J.K., Schafer D., Compans R.W. et Mestecky J. (1993) Oral immunization with influenza virus in biodegradable microspheres. *J. Infect. Dis.* **167**, 84-90.

Monfardini C. et Veronese F.M. (1998) Stabilization of substances in circulation. *Bioconjugate Chem.* **9**, 418-450.

Monteiro-Rivière N.A. et Popp J.A. (1984) Ultrastructural characterization of the nasal respiratory epithelium in the rat. *Am. J. Anat.* **169**, 31-43.

Mora A.L., Tam J.P., Heritage P.L., Brook M.A., Underdown P.J. et Mc Dermott M.R. (1998) Controlled lipidation and encapsulation of peptides as a useful approach to mucosal immunizations. *J. Immunol.* **161**, 3616-3623.

Morein B., Sundquist B., Höglund S., Dalsgaard K. et Osterhaus A. (1984) ISCOM, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature* **308**, 457-460.

Mori A., Klibanov A.L., Torchilin V.P. et Huang L. (1991) Influence of the steric barrier activity of amphipathic poly(ethylene) glycol and ganglioside GM1 on the circulation time of liposomes and on the target binding of immunoliposomes *in vivo*. *FEBS Letters* **284**, 263-266.

Morikawa K., Okada F., Hosokawa M. et Kobayashi H. (1987) Enhancement of therapeutic effects of recombinant interleukin-2 on a transplantable rat fibrosarcoma by the use of a sustained release vehicle, Pluronic gel. *Cancer* **47**, 37-41.

Morimoto K., Katsumata H., Yabuta T., Iwanaga K., Kakemi M., Tabata Y. et Ikada Y. (2001) Evaluation of gelatin microspheres for nasal and intramuscular administrations of salmon calcitonin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **13**, 179-185.

Morimoto K., Katsumata H., Yabuta T., Iwanaga K., Kakemi M., Tabata Y. et Ikada Y. (2000) Gelatin microspheres as a pulmonary delivery system: evaluation of salmon calcitonin absorption. *J. Pharm. Pharmacol.* **52**, 611-617.

Morishita M., Morishita I., Takayama K., Machida Y. et Nagai T. (1992a) Novel oral microspheres of insulin with protease inhibitor protecting from enzymatic degradation. *Int. J. Pharm.* **78**, 1-7.

Morishita I., Morishita M., Takayama K., Machida Y. et Nagai T. (1992b) Hypoglycemic effect of novel oral microspheres of insulin with protease inhibitor in normal and diabetic rats. *Int. J. Pharm.* **78**, 9-16.

Mosahebi A., Simon M., Wiberg M. et Terenghi G. (2001) A novel alginate hydrogel as Schwann cell matrix. *Tissue Eng.* **7**, 525-534.

Mountain A. (2000) Gene therapy: the first decade. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 119-128.

Mukherji G., Murthy R. et Miglani B. (1990) Preparation and evaluation of cellulose nanospheres containing 5-fluorouracil. *Int. J. Pharm.* **65**, 1-5.



Müller B.G. et Kissel T. (1993) Camouflage nanospheres: a new approach to bypassing phagocytic blood clearance by surface modified particulate carriers. *Pharm. Pharmacol. Lett.* **3**, 67-70.

Muller D., Foulon M., Bonnemain B. et Vandamme T.F. (2000) Niosomes as carriers of radiopaque contrast agents for X-ray imaging. *J. Microencapsul.* **17**, 227-243.

Muranishi S. (1990) Absorption enhancers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **7**, 1-33.

Mygind N. et Dahl R. (1998) Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **29**, 3-12.

Nagai T., Nishimoto Y., Nambu N., Suzuki Y. et Sekine K. (1984) Powder dosage form of insulin for nasal administration. *J. Control. Release* **1**, 15-22.

Nakada Y., Fattal E., Foulquier M. et Couvreur P. (1996) Pharmacokinetics and biodistribution of oligonucleotide adsorbed onto poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles after intravenous administration in mice. *Pharm. Res.* **13**, 38-43.

Nakase H., Okazaki K., Tabata Y., Ozeki M., Watanabe N., Ohana M., Uose S., Uchida K., Nishi T., Matsuura M., Tamaki H., Itoh T., Kawanami C. et Chiba T. (2002) New cytokine delivery system using gelatin microspheres containing interleukin-10 for experimental inflammatory bowel disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**, 59-65.

Nalbandian R.M., Henry R.L., Balko R.W., Adams D.V. et Neuman N.R. (1987) Pluronic F-127 gel preparation as an artificial skin in the treatment of third degree burns in pigs. *J. Biomed. Mater. Res.* **21**, 1135-1148.

Natsume H., Sugibayashi K., Juni K., Morimoto Y., Shibata T. et Fujimoto S. (1990) Preparation and evaluation of biodegradable albumin microspheres containing mitomycin C. *Int. J. Pharm.* **58**, 79-87.

Nawroth P.P., Bank I., Handley D., Cassimeris J., Chess L. et Stern D. (1986) Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin-1. *J. Exp. Med.* **164**, 1363-1375.

Nemoto R., Kato T., Iwata K., Mori H. et Takahashi M. (1981) Evaluation of therapeutic arterial embolization in renal cell carcinoma using microencapsulated mitomycin C. *Urology* **17**, 315-319.

Neutel J.M. et Smith D.H. (1997) The circadian pattern of blood pressure : cardiovascular risk and therapeutic opportunities. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **6** (3), 250-256.

Neutra M.R., Frey A. et Kraehenbuhl J.P. (1996) Epithelial M cells : gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* **86**, 345-348.

Nicholson P.C. et Vogt J. (2001) Soft contact lens polymers :an evolution. *Biomaterials* **22**, 3273-3283.

Nishimura K., Nishimura S., Seo H., Nishi N., Tokura S. et Azuma I. (1986) Macrophage activation with multiporous beads prepared from partially deacetylated chitin. *J. Biomed. Mater. Res.* **20**, 1359-1372.

Niven R.W. (1995) Delivery of biotherapeutics by inhalation aerosol. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems* **12**, 151-173.

Niven R.W., Whitcomb K.L., Shaner L., Ralph L.D., Habberfield A.D. et Wilson J.V. (1994) Pulmonary absorption of polyethylene glycolated recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (PEG rhG-CSF). *J. Control. Release* **32**, 177-189.

Norris D.A., Puri N. et Sinko P.J. (1998) The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **34**, 135-154.

Norris D.A. et Sinko P.J. (1997) Effect of size, surface charge and hydrophobicity on the translocation of polystyrene micropsheres through gastrointestinal mucin. *J. Appl. Poly. Sci.* **63**, 1481-1492.

O'Hagan D.T. (1998) Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **34**, 305-320.

O'Hagan D.T. et Illum L. (1990) Absorption of peptides and proteins from the respiratory tract and the potential for development of locally administered vaccine. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems* **7**, 35-97.

O'Hagan D.T., Palin K.J., Davis S.S., Artursson P. et Sjöholm I. (1989) Microparticles as potentially orally active immunological adjuvants. *Vaccine* **7**, 421-424.

O'Mullane J., Petrak K., Hutchinson L. et Tomlinson E. (1990) The effect of adsorbed coats of Poloxamers 237 and 338 on the *in vitro* aggregation and *in vivo* distribution of polystyrene latex particles. *Int. J. Pharm.* **63**, 177-180.

- Ogmundsdotti H. et Weir D.M. (1980) Mechanisms of macrophage activation. *Clin. Exp. Immunol.* **40**, 223-234.
- Ogura Y. et Kimura H. (1995) Biodegradable polymer microspheres for targeted drug delivery to the retinal pigment epithelium. *Survey of Ophthalmology* **39** (Suppl.), S17-S24.
- Okumura K., Iwakawa S., Yoshida T., Seki T. et Komada F. (1992) Intratracheal delivery of insulin : Absorption from solution and aerosol by rat lung. *Int. J. Pharm.* **88**, 63-69.
- Olbrich C., Bakowsky U., Lehr C.M., Müller R.H. et Kneuer C. (2001) Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. *J. Control. Release* **77**, 345-355.
- Ozel M., Hoglund S., Gelderblom H.R. et Morein B. (1989) Quaternary structure of the immunostimulating complex (ISCOM). *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* **102**, 240-248.
- Padmanabhan, R.V., Gudapaty R., Liener I.E., Schwartz V.A. et Hoidal J.R. (1985) Protection against pulmonary oxygen toxicity in rats by the intratracheal administration of liposome-encapsulated superoxide dismutase or catalase. *Am. Rev. Respir. Dis.* **132**, 164-167.
- Panagi Z., Beletsi A., Evangelatos G., Livianou E., Ithakissios D.S. et Avgoustakis K. (2001) Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **221**, 143-152.
- Pang S.N.J. (1993) Final report on the safety of poly(ethylene glycols) 6, 8, 32, 75, 150, 14M. *J. Am. Coll. Toxicol.* **12**, 429-456.
- Papahadjopoulos D., Allen T.M., Gabizon A., Mayhew E., Matthay K. et Huang S.K. (1991) Sterically stabilized liposomes : Improvements in pharmacokinetics and antitumour therapeutic efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 11460-11464.
- Park T.G. et Hoffman A.S. (1993) Thermal cycling effects on the bioreactor performances of immobilized  $\beta$ -galactosidase in temperature-sensitive hydrogel beads. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 476-482.
- Park T.G. et Hoffman A.S. (1990) Immobilization of *Arthrobacter simplex* in thermally reversible hydrogel : effect of temperature cycling on steroid conversion. *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 152-159.
- Patton J.S. (1996) Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **19**, 3-36.

Patton J.S., Trinchero P. et Platz R.M. (1994) Bioavailability of pulmonary delivery peptides and proteins :  $\alpha$ -interferon, calcitonins and parathyroid hormone. *J. Control. Release* **28**, 79-85.

Patton J. S. et Platz R.M. (1992) Routes of delivery : Case studies. Pulmonary delivery of peptides and proteins for systemic action. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **8**, 179-196.

Paul M., Durand R., Boulard Y., Fusai T., Fernandez C., Rivollet D., Deniau M. et Astier A. (1998) Physicochemical characteristics of pentamidine-loaded polymethacrylate nanoparticles : implication in the intracellular drug release in *Leishmania* infected mice. *J. Drug Target.* **5**, 481-490.

Pennington A.K., Ratcliffe J.H., Wilson C.G. et Hardy J.G. (1988) The influence of solution viscosity on nasal spray deposition and clearance. *Int. J. Pharm.* **43**, 221-224.

Peracchia M.T., Fattal E., Desmaële D., Besnard M., Noël J.P., Gomis J.M., Appel M., d'Angelo J. et Couvreur P. (1999) Stealth® PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *J. Control. Release* **60**, 121-128.

Pereswetoff-Morath L. (1998) Microspheres as nasal drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **29**, 185-194.

Pereswetoff-Morath L. et Edman P. (1996) Immunological consequences of nasal drug delivery in dextran microspheres and ethyl(hydroxyethyl)cellulose in rats. *Int. J. Pharm.* **128**, 23-28.

Perez C., Sanchez A., Putnam D., Ting D., Langer R. et Alonso M.J. (2001) Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *J. Control. Release* **75**, 211-224.

Petrak K. (1993) Design and properties of particulate carriers for intravascular administration. In *Pharmaceutical Particulate Carriers*. Rolland A. (Ed.), Marcel Dekker, New York.

Pignatello R., Amico D., Chiechio S., Spadaro C., Puglisi G. et Giunchedi P. (2001) Preparation and analgesic activity of Eudragit RS100 microparticles containing diflunisal. *Drug Deliv.* **8**, 35-45.

Poznansky M.J. et Juliano R.L. (1984) Biological approaches to the controlled delivery of drugs : A critical review. *Pharmacol. Rev.* **36**, 277-336.

Powell D.W. Intestinal water and electrolyte transport. In *Physiology of the gastrointestinal tract*. Johnson L.R. (Ed). 2<sup>nd</sup> edition, Raven Press, New York, NY, 1981, pp 1267.

Proctor D.F., The mucociliary system. In *The nose : upper airway physiology and the atmospheric environment*. Proctor, D.F. and Andersen I. (Eds), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982, pp 245-278.

Puisieux F., Barratt G., Couarraze G., Couvreur P., Devissaguet J.P., Dubernet C., Fattal E., Fessi H., Benita S. et Vauthier C.. Polymeric micro- and nanoparticles as drug carriers. In *Polymeric Biomaterials*. Dumitriu S., Ed., Marcel Dekker Inc, New York, 1994, Chapter 16, p 749-794.

Putney S.D. et Burke P.A. (1998) Improving protein therapeutics with sustained-release formulations. *Nature Biotechnology* **16**, 153-157.

Qiu Y. et Park K. (2001) Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **53**, 321-339.

Rajaonarivony M., Vauthier C., Couarraze G., Puisieux F. et Couvreur P. (1993) Development of a new drug carrier made from alginate. *J. Pharm. Sci.* **82**, 912-917.

Ranasinha C., Assoufi B., Shak S., Christiansen D., Fuchs H., Empey D., Geddes D. et Hodson M. (1993) Efficacy and safety of short term administration of aerosolized recombinant human DNAse I in adults with stable stage cystic fibrosis. *Lancet* 199-202.

Rihova B. (1996) Biocompatibility of biomaterials: hemocompatibility, immunocompatibility and biocompatibility of solid polymeric materials and soluble targetable polymeric carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **21**, 157-176.

Ringdorf H. (1975) Structure and properties of pharmacologically active polymers. *J. Polym. Sci. , Polym. Symp.* **51**, 135-153.

Robbins P.D., Tahara H. et Ghivizzani S.C. (1998) Viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol.* **16**, 35-40.

Rogerson A., Cummings J., Willmott N. et Florence A.T. (1988) The distribution of doxorubicin in mice following administration in niosomes. *J. Pharm. Pharmacol.* **40**, 337-342.

Roitt I., Brostoff J. et Male D. (1985) Immunologie appliquée. Médecine et Sciences internationales, Paris, p 7.1-11.11.

Roy I., Sastry M.S., Johri B.N. et Gupta M.N. (2000) Purification of alpha amylase isoenzymes from *Scytalidium thermophilum* on a fluidized bed of alginate beads followed by concanavalin A-agarose column chromatography. *Protein Expr. Purif.* **20**, 162-168.

Ruffin R.E., Dolovich M.B., Oldenburg F.A. et Newhouse M.T. (1986) The preferential deposition of inhaled isoproterenol and propanolol in asthmatic patients. *Chest* **80**, 904-907.

Saba T.M. (1970) Physiology and physiopathology of the reticuloendothelial system. *Arch. Intern. Med.* **126**, 1031-1052.

Saitoh H., Takata T., Nikai H., Shintani H., Hyon S.-H. et Ikada Y. (1994) Effect of poly(lactic acid) on osteoinduction of demineralized bone: preliminary study of the usefulness of poly(lactic acid) as a carrier of bone morphogenetic protein. *J. Oral Rehab.* **21**, 431-438.

Sakagami M., Sakon K., Kinoshita W. et Makino Y. (2001) Enhanced pulmonary absorption following aerosol administration of mucoadhesive powder microspheres. *J. Control. Release* **77**, 117-129.

Saphiro J., Reisner S., Litchenberg G. et Meltzer R. (1990) Intravenous contrast echocardiography with use of sonicated albumin in humans: systolic disappearance of left ventricular contrast after transpulmonary transmission. *J. Am. Coll. Cardiol.* **16**, 1603.

Sawada K., Shimoyama T., Machelsky P.S., Goldcamp J.B. et Omokawa S. (1993) Evaluation of a relationship between polymer bulk hydroxyl and surface oxygen content and *in vitro* serum-material interaction. *J. Biomed. Mater. Res.* **27**, 547-555.

Sawaya A., Benoit J.P. et Benita S. (1987) Binding mechanism of doxorubicin in ion-exchange albumin microcapsules. *J. Pharm. Sci.* **76**, 475-480.

Schanker L.S. et Hemberger J.A. (1983) Relation between molecular weight and pulmonary absorption rate of lipid-insoluble compounds in neonatal and adult rats. *Bioch. Pharmacol.* **32**, 2599-2601.

Schanker L.S. (1978) Drug absorption from the lung. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 381-385.

Schneeberger E.E. et Lynch R.D. (1992) Structure, function and regulation of cellular tight junctions. *Am. J. Physiol.* **262**, L647-L-661.

Scheffel U., Rhodes B.A., Natarajan T.K. et Wagner H.N. (1972) Albumin microspheres for study of the reticulo- endothelial system. *J. Nucl. Med.* **13**, 498-503.

Schlegel P.N., Kuzma P., Frick J., Farkas A., Gomahr A., Spitz I., Chertin B., Mack D., Jungwirth A., King P., Nash H., Bardin C.W. et Moo-Young A. (2001) Effective long-term androgen suppression in men with prostate cancer using a hydrogel implant with the GnRH agonist histrelin. *Urology* **58**, 578-582.

Schöler N., Hahn H., Müller R.H. et Liesenfeld O. (2002) Effect of lipid matrix and size of solid lipid nanoparticles (SLN) on the viability and cytokine production of macrophages. *Int. J. Pharm.* **231**, 167-176.

Schöler N., Zimmermann E., Katzfey U., Hahn H., Müller R.H. et Liesenfeld O. (2000) Effect of solid lipid nanoparticles on cytokine production and the viability of murine peritoneal macrophages. *J. Microencapsul.* **17**, 639-650.

Schudel M. et Ringgenberg R. (2001) Flavors and fragrance delivery systems. *Chimia* **55**, 421-428.

Scieszka J., Maggiora L., Wright S. et Cho M. (1991) The role of complements C3 and C5 in the phagocytosis of liposomes by human neutrophils. *Pharmacol. Res.* **8**, 65-69.

Sehon A.H. (1991) Suppression of antibody responses by conjugates of antigens and monomethoxypoly(ethylene glycol). *Adv. Drug Deliv. Rev.* **6**, 203-217.

Seijo B., Fattal E., Roblot-Treupel L. et Couvreur P. (1990) Design of nanoparticles of less than 50nm diameter: preparation, characterization and drug loading. *Int. J. Pharm.* **62**, 1-7.

Senior J., Delgado C., Fisher D., Tilcock C. et Gregoriadis G. (1991) Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation.: studies with poly(ethylene glycol) coated vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1062**, 77-82.

Shah S., Qaqish R., Patel V. et Amiji M. (1999) Evaluation of the factors influencing stomach-specific delivery of antibacterial agents for *Helicobacter pylori* infection. *J. Pharm. Pharmacol.* **51**, 667-672.

- Shahin R., Leef M., Eldridge J., Hudson M. et Gilley R. (1995) Adjuvancity and protective immunity elicited by *Bordetella pertussis* antigens encapsulated in poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *Infect. Immun.* **63**, 1195-1200.
- Shak S., Capon D.J., Hellmiss R., Marsters S.A. et Baker C.L. (1990) Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 9188-9192.
- Shao Z., Li Y. et Mitra A.K. (1994) Cyclodextrins as mucosal absorption promoters of insulin. III. Pulmonary route of delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **40**, 283-288.
- Shen Z.C., Cheng Y., Zhang Q., Wei S.L., Li R.C. et Wang K. (2000) Lanthanides enhance pulmonary absorption of insulin. *Biol. Trace Elem. Res.* **75**, 215-225.
- Sheppard J.I., Mc Clung W.J. et Feuerstein I.A. (1994) Adherent platelet morphology on adsorbed fibrinogen: effects of protein incubation time and albumin addition. *J. Biomed. Mater. Res.* **28**, 1175-1186.
- Siegel R.A., Falamarzian M., Firestone B.A. et Moxley B.C. (1988) pH-controlled release from hydrophobic/polyelectrolyte copolymer hydrogels. *J. Control. Release* **8**, 179-182.
- Simon L., Shine G. et Dayan A.D. (1995) Translocation of particulates across the gut wall-a quantitative approach. *J. Drug Target.* **3**, 217-219.
- Sinha J., Raay B., Das N., Medda S., Garai S., Mahato S.B. et Basu M.K. (2002) Bacopasaponin C: critical evaluation of anti-leishmanial proprties in various delivery modes. *Drug Deliv.* **9**, 55-62.
- Skerrett S.J. et Martin T.R. (1994) Intratracheal interferon-gamma augments pulmonary defenses in experimental legionellosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **149**, 50-58.
- Skubitz K.M. et Anderson P.M. (2000) Inhalational interleukin-2 liposomes for pulmonary metastases: a phase I clinical trial. *Anticancer Drugs* **11**, 555-563.
- Sminia T. et Kraal G., Nasal-associated lymphoid tissue. In *Mucosal Immunology*. Ogra P.L., Mestecky J., Lamm M.E., Strober W., Bienenstock J. et McGhee J.R. (Eds). Academic Press, San Diego, 1999, pp 357-364.
- Smith E.B. et Staples E.M. (1982) Intimal and media plasma protein concentrations and endothelial function. *Artherosclerosis* **41**, 295-308.



Smith P.L. (1997) Peptide delivery via the pulmonary route: a valid approach for local and systemic delivery. *J. Control. Release* **46**, 99-106.

Smith P.L., Wall D.A., Gochoco C. et Wilson G. (1992) Oral absorption of peptides and proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **8**, 253-290.

Smolensky M.H. et Portaluppi F. (1999) Chronopharmacology and chronotherapy medications :relevance to prevention and treatment of coronary heart disease. *Am. Heart J.* **137** (4 Pt 2), S14-S24.

Soane R.J., Frier M., Perkins A.C., Jones N.S., Davis S.S. et Illum L. (1999) Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans. *Int. J. Pharm.* **178**, 55-65.

Spenlehauer G., Vert M., Benoit J. P. et Bodaert A. (1989) *In vitro* and *in vivo* degradation of poly(D,L-lactide-co-glycolide) type microspheres made by solvent evaporation method. *Biomaterials* **10**, 557-563.

Spenlehauer G., Vert M., Benoit J.P., Chabot F. et Veillard M. (1988) Biodegradable cisplatin microspheres prepared by the solvent evaporation method: morphology and release characteristics. *J. Control. Release* **7**, 217-229.

Stanislowski L., De Nechaud B. et Christel P. (1995) Plasma protein adsorption to artificial ligament fibers. *J. Biomed. Mater. Res.* **29**, 315-323.

van Steenberg W. (1993) Alpha-1 antitrypsin deficiency: an overview. *Acta Clin. Belg.* **48**, 171-189.

Storm G., Belliot S.O., Daemen T. et Lasic D.D. (1995) Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **17**, 31-48.

Strous G.J. et Dekker J. (1992) Mucin-type glycoproteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27**, 57-92.

Sturesson C. et Degling Wikingsson L. (2000) Comparison of poly(acryl) starch and poly(lactide-co-glycolide) microspheres as drug delivery system for a rotavirus vaccine. *J. Control. Release* **68**, 441-450.

Sturzl M., Zietz C., Eisenburg B., Goebel F.D., Gillitzer R., Hofscneider P.H. et Bogner J.R. (1994) Liposomal doxorubicin in the treatment of AIDS-associated Kaposi's sarcoma: clinical, histological and cell biological evaluation. *Res. Virol.* **145**, 261-269.

Suarez S., Garcia-Contreras L., Sarubbi D., Flanders E., O'Toole D., Smart J. et Hickey A.J. (2001) Facilitation of pulmonary absorption by H-MAP: Pharmacokinetics and pharmacodynamics in rats. *Pharm. Res.* **18**, 1677-1684.

Supersaxo A., Hein W.R. et Steffen H. (1990) Effect of molecular weight on the lymphatic absorption of water-soluble compounds following subcutaneous administration. *Pharm. Res.* **7**, 167-169.

Suzuki M., Machida M., Adachi K., Otabe K., Sugimoto T., Hayashi M. et Awazu S. (2000) Histopathological study of the effects of a single intratracheal instillation of surface active agents on lung in rats. *J. Toxicol. Sci.* **25**, 49-55.

Tabata Y., Hijikata S., Muniruzzaman M. et Ikada Y. (1999) Neovascularization effect of biodegradable gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **10**, 79-94.

Tabata Y. et Ikada Y. (1987) Macrophage activation through phagocytosis of muramyl dipeptide encapsulated in gelatin microspheres. *J. Pharm. Pharmacol.* **39**, 698-704.

Takakura Y., Mahoto R.I. et Hashisa M. (1998) Extravasation of macromolecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **34**, 93-108.

Takemura R. et Werb Z. (1984) Secretory products of macrophages and their physiological functions. *Am. J. Physiol.* **246**, C1-C9.

Tan J.S., Butterfield D.E., Voychek C.L., Caldwell K.D. et Li J.T. (1993) Surface modification of nanoparticles by PEO/PPO block copolymers to minimize interactions with blood components and prolong blood circulation in rats. *Biomaterials* **14**, 823-833.

Taylor A.E. et Gaar Jr K.A. (1970) Estimation of equivalent pore radii of pulmonary capillary and alveolar membranes. *Am. J. Physiol.* **218**, 1133-1140.

Thanou M., Verhoef J.C. et Junginger H.E. (2001) Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **50**, S91-S101.

Thomas N.W., Jenkins P.G., Howard K.A., Smith M.W., Lavelle E.C., Holland J. et Davis S.S. (1996) Particle uptake and translocation across epithelial membranes. *J. Anat.* **189**, 487-490.

Todd C.W., Balusubramanian M. et Newman M.J. (1998) Development of adjuvant-active nonionic block copolymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **32**, 199-223.

Tolino A., Romano L., Ronsini S., Riccio S. et Montemagno U. (1993) Treatment of postmenopausal osteoporosis with salmon calcitonin nasal spray: evaluation by bone mineral content and biochemical patterns. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **31**, 358-360.

Torchilin V.P. (2001) Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *J. Control. Release* **73**, 137-172.

Torchilin V.P. (1998) Polymer-coated long-circulating microparticulate pharmaceuticals. *J. Microencapsul.* **15**, 1-19.

Torchilin V.P. et Trubetskoy V.S. (1995) Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **16**, 141-155.

Torchilin V.P. et Papisov M.I. (1994a) Hypothesis: why do polyethylene glycol-coated liposomes circulate so long? *J. Liposome Res.* **4**, 725-739.

Torchilin V.P., Omelyanenko V.G., Papisov I.M., Bogdanov Jr A.A., Trubetskoy V.S., Herron J.N. et Gentry C.A. (1994b) Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. *Biochim. Biophys. Acta* **1195**, 11-20

Torchilin V.P., Trubetskoy V.S., Milshteyn A.M., Canillo J., Wolf G.L., Papisov M.I. (1994c) Targeted delivery of diagnostic agents by surface modified liposomes. *J. Control. Release* **28**, 45-58.

Torchilin V.P., Voronkov J.I. et Mazoev A.V. (1982) The use of immobilized streptokinase (Streptodezaka) for the therapy of thromboses. *Ther. Arch. Russ.* **54**, 21-25.

Tsujimoto M., Yokota S., Vilcek J. et Weissmann G. (1986) Tumor necrosis factor provokes superoxide anion generation from neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**, 1094-1100.

Triozzi P.L., Stevens V.C., Aldrich W., Powell J., Todd C.W. et Newman M.J. (1997) Effects of beta-human gonadotropin subunit immunogen administered in aqueous solution with a novel nonionic block copolymer adjuvant in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.* **3**, 2355-2362.

Tröster S.D., Müller U. and Kreuter J. (1990) Modification of the body distribution of poly(methyl methacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants. *Int. J. Pharm.* **61**, 85-100.

Truong-Le V.L., August J.T. et Leong K.W. (1998) Controlled gene delivery by DNA-gelatin microspheres. *Human Gene Ther.* **9**, 1709-1717.

Ugozzoli M., O'Hagan D.T. et Ott G.S. (1998) Intranasal immunization of mice with herpes simplex virus type 2 recombinant gD2: the effect of adjuvants on mucosal and serum antibody responses. *Immunology* **93**, 563-571.

Vaage J., Mayhew E. et Martin F. (1992) Therapy of primary and metastatic mouse mammary carcinomas with doxorubicin encapsulated in long circulating liposomes. *Int. J. Cancer* **51**, 942-948.

Vajdy M. et O'Hagan D.T. (2001) Microparticles for intranasal immunization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **51**, 127-141.

Van Bree C., Krooshoop J.J., Rietbroek R.C., Kipp J.B. et Bakker P.J. (1996) Hyperthermia enhances tumor uptake and antitumor efficacy of thermostable liposomal daunorubicin in a rat solid tumor. *Cancer Res.* **56**, 563-568.

Van der Lubben I.M., Verhoef J.C., Borchard G. et Junginger H.E. (2001) Chitosan for mucosal vaccination. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **52**, 139-144.

Vandelli M.A., Rivasi F., Guerra P., Forni F. et Arletti R. (2001) Gelatin microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterization, *in vitro* and *in vivo* studies. *Int. J. Pharm.* **215**, 175-184.

Vauthier-Holtzscheler C., Benabbou S., Spenlehauer G., Veillard M. et Couvreur P. (1991) Methodology for the preparation of ultra-dispersed polymer systems. *S.T.P. Pharma* **1**, 109-116.

Verdun C., Couvreur P., Vranckx H. et Lenaerts V. (1986) Development of nanoparticle controlled release formulation for human use. *J. Control. Release* **3**, 205-210.

Veronese F.M. et Morpurgo M. (1999) Bioconjugation in pharmaceutical industry. *Il Farmaco* **54**, 497-516.

- Wagner J.A. (1998) Efficient and persistent gene transfer of AAV-CFTR in maxillary sinus. *Lancet* **351**, 1702-1703.
- Walday P., Tolleshaug H., Gjoen T., Kindberg G.M., Berg T., Skotland T. et Holtz E. (1994) Biodistributions of air-filled albumin microspheres in rats and pigs. *Biochem. J.* **299**, 437-443.
- Waltrous-Peltier N., Uhl J., Steel V., Brophy L. and Merisko-Liversidge E. (1992) Direct suppression of phagocytosis by amphipathic polymeric surfactants. *Pharm. Res.* **9**, 1177-1183.
- Wang J., Tabata Y., Bi D. et Morimoto K. (2001) Evaluation of gastric mucoadhesive properties of aminated gelatin microspheres. *J. Control. Release* **73**, 223-231.
- Wang J., Tauchi Y., Deguchi Y., Morimoto K., Tabata Y. et Ikada Y. (2000) Positively charged gelatin microspheres as gastric mucoadhesive drug delivery system for eradication of *H. pylori*. *Drug. Deliv.* **7**, 237-243.
- Washington N., Washington C. et Wilson C.G. Pulmonary Drug Delivery In *Physiological Pharmaceutics, Barriers to Drug Absorption.*, Second Edition, Taylor and Francis, New York, 2001, Chapter 8, p181-247.
- Watnasirichaikul S., Rades T., Tucker I. et Davies N. (2002) *In vitro* release and oral bioactivity of insulin in diabetic rats using nanocapsules dispersed biocompatible microemulsion. *J. Pharm. Pharmacol.* **54**, 473-480.
- Watnasirichaikul S., Davies N., Rades T. et Tucker I. (2000) Preparation of biodegradable insulin nanocapsules from biocompatible microemulsions. *Pharm. Res.* **17**, 684-689.
- Weber C., Kreuter J. et Langer K. (2000) Desolvation process and surface characteristics of human serum albumin nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **196**, 197-200.
- Weiss G., Yamaguchi H., Ibuki R., Yasumura M. et Ohnishi N. (1998) Microencapsulation of the renin inhibitor FK906 by phase separation of ethyl cellulose in cyclohexane. *J. Microencapsul.* **15**, 335-346.
- Wichterle O. et Lim D. (1960) Hydrophilic gels in biologic use. *Nature* **185**, 117.
- Widder K., Flouret G. et Sewyei A. (1979) Magnetic microspheres, synthesis of a novel parenteral drug carrier. *J. Pharm. Sci.* **68**, 79-81.

Wigley F.M., Londono J.H., Wood S.H., Shipp J.C. et Waldman R.H. (1971) Insulin across respiratory mucosae by aerosol delivery. *Diabetes*. **20**, 552-556.

Wilkins D.J. et Myers P.A. (1966) Studies on the relationship between the electrophoretic properties of colloids and their blood clearance and organ distribution in the rat. *Br. J. Exp. Pathol.* **47**, 568-576.

Williams M.C. (1984) Endocytosis in alveolar type-2 cells: effect of charge and size of tracers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 6054-6058.

Wollmer P., Backstrom K., Zhao H., Nilsson P.G. et Jonson B. (2000) Surface active agents as enhancers of alveolar absorption. *Pharm. Res.* **17**, 38-41.

Wu H.Y., Nguyen H.H. et Russell M.W. (1997) Nasal lymphoid tissue as a mucosal immune inductive site. *Scand. J. Immunol.* **46**, 506-513.

Wu H.Y. et Russell M.W. (1997) Nasal lymphoid tissue, intranasal immunization, and compartmentalization of the common mucosal immune system. *Immunol. Res.* **16**, 187-201.

Yamamoto A., Taniguchi T., Rikyu K., Tsuji T., Fujita T., Murakami M. et Muranishi S. (1994a) Effect of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats. *Pharm. Res.* **11**, 1496-1500.

Yamamoto A., Umemori S. et Muranishi S. (1994b) Absorption enhancement of intrapulmonary administered insulin by various absorption enhancers and protease inhibitors in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 14-18.

Yannas I.V., Lee E. et Orgill D.P. (1989) Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 933-937.

Yeh P.Y., Ellens H. et Smith P.L. (1998) Physiological considerations in the design of particulate dosage forms for oral vaccine delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **34**, 123-133.

Yokoyama M., Miyauchi M., Yamada N., Okano T., Sakurai Y., Kataoka K. et Inoue S. (1990) Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric anti-cancer drug adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. *Cancer Res.* **50**, 1693-1700.

Yoshida H., Okumura K., Hori R., Anmo T. et Yamaguchi H. (1979) Absorption of insulin delivered to rabbit trachea using aerosol dosage form. *J. Pharm. Sci.* **68**, 670-671.

Zalipsky S. (1995) Chemistry of poly(ethylene glycol) conjugates with biologically active molecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **16**, 157-182.

Zhang Q., Shen Z. et Nagai T. (2001) Prolonged hypoglycemic effect of insulin-loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles after pulmonary administration to normal rats. *Int. J. Pharm.* **218**, 75-80.

Zhao X. et Harris J.M. (1998) Novel degradable poly(ethylene glycol) hydrogels for controlled release of protein. *J. Pharm. Sci.* **11**, 1450-1457.